UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade De Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal:
predisposição à dependência de drogas de abuso na adolescência

Tatiana Costa Andrioli

Dissertação para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Tania Marcourakis

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade De Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal:
predisposição à dependência de drogas de abuso na adolescência

Tatiana Costa Andrioli

Versão corrigida da Dissertação
conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Tania Marcourakis

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Andrioli, Tatiana Costa

A573e Exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal : predisposição à dependência de drogas de abuso na adolescência / Tatiana Costa Andrioli. -- São Paulo, 2016. 116p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Marcourakis, Tania

Co-orientador: Pacheco, Larissa Helena Lobo Torres

1. Toxicologia 2. Sistema nervoso central 3. Drogas de abuso 4. Cocaína I. T. II. Marcourakis, Tania, orientador III. Pacheco, Larissa Helena Lobo Torres, co-orientador.

615.9 CDD

Tatiana Costa Andrioli

Exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal:
predisposição à dependência de drogas de abuso na adolescência

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof^a. Dr^a. Tania Marcourakis
Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, 26 de agosto de 2016.

Família,
são anjos que estão o tempo todo com a gente, nos dando força, nos apoiando e não medindo esforços para ver nosso sucesso, obrigada por ter vocês como exemplo e como minha família. Aprendi o verdadeiro significado de amar, e recebo tudo isso seja em uma oração ou em um sorriso, e com isso qualquer dificuldade foi passageira. À minha mãe Célia, ao meu pai Hamilton, à minha vó Niquinha, ao meu vô Toni, à minha vó Tereza (*in memorian*) e meu vô Cidir (*in memorian*) que lá de cima foram meus anjos e protetores, obrigada por me guiarem. Ao meu irmão Junior e em especial à minha irmã Veridiana, pelo exemplo de vida e de pessoa que busco ser, te admiro muito. Amo vocês!

A vida existe para ser trilhada, para ser incrementada e para ser superada. Agradeço de coração àquelas pessoas que estiveram comigo e me auxiliaram a crescer. Aprendi que na vida não agradecemos pela ajuda cedida ou fornecida, agradecemos pela partilha, seja a de conhecimentos, seja a de vivência. E precisamos fazer escolhas, e são as mesmas que nos fazem conhecer a nós mesmos, nos fazem crescer e nos fazem viver!

À Profª Drª Tania Marcourakis

Por me dar espaço ao expor idéias e por confiar em mim, por nunca negar uma ajuda, por me ensinar pensar antes de falar, por me ensinar a ouvir críticas e por eu poder ter aprendido a melhorar com as mesmas. Tenho muita admiração e orgulho da orientadora que tive e hoje sei o real significado de orientar, e essa orientação e respeito será para a vida. Obrigada de coração por tudo.

À Prof^a. Dr^a. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

À profissional, à amiga e a minha segunda orientadora a qual admiro e me inspiro. À que me abriu portas para poder crescer e por ter ajudado a construir a pessoa que sou hoje, melhor que ontem. Por confiar em mim e me guiar desde o meu primeiro dia, tanto em minha vida pessoal quanto profissional. Agradeço todos os dias por ter tido o privilégio de conhecer a Larissa profissional e pessoal, tenho muito orgulho de você.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Rosana Camarini do Departamento de Farmacologia do ICB/USP, pela confiança, colaboração, discussão de protocolos e dos resultados.

Aos meus grandes amigos do lab, à Mariana Aguilera, à Stephanie, à Ana Carolina, à Sayuri, à Lídia, à Juli, à Larissa, ao Raphael, levarei vocês para a vida, aprendi muito com vocês e em cada situação que passamos. Formamos uma equipe e grandes amigos aqui, sem vocês nada disso seria possível, meu muito obrigada pela paciência e por me conhecerem mais do que eu mesma.

Aos nossos alunos de iniciação científica, à Natália Trigo, à Thalita, à Andreza, à Mariane, ao Leandro e em especial à Letícia Onety, pela amizade, pelo aprendizado, por compartilharmos situações, desafios, superações, situações essas que levaram ao aprimoramento mútuo.

Aos alunos da Prof^a. Dr^a. Rosana Camarini, à Patrícia, à Cristina, ao Marcos, à Priscila Nascimento, ao André, ao Gabriel e em especial à Mariana Beu Rae pela amizade, pelos desabafos, pelas risadas sensacionais, pelas longas conversas entre uma reunião e outra, pelo auxílio no planejamento dos testes comportamentais, pela tranquilidade, e por encontrar uma saída quando achava que tudo estaria perdido, meu muito obrigada, minha admiração e respeito, você é incrível e tem um futuro incomparável pela frente.

Aos alunos do Prof. Dr. Maurício Yonamine com as dosagens de cotinina e nicotina, principalmente à Margarita Maria (Maita) e à Sarah. À Ana Miguel e à Gabriela, pelas conversas e incentivos tanto pessoais quanto profissionais, sem vocês o ambiente não seria o mesmo, que honra poder ter conhecido vocês. Em especial à Maita pela amizade, carinho, respeito, e pela confiança que criamos, com você tudo ficou e fica mais fácil, te admiro muito e te levo para vida.

Aos funcionários e ex-funcionários do LAT, especialmente ao Angelo Balestrin pelo carinho, pelas conversas, pelos aprendizados, pelos churrascos e por sempre me animar, e à Beatriz pelas longas conversas sobre a vida e a carreira, pelo carinho, sabedoria e pela grande amizade, como também pela pessoa que tive a sorte em ter em minha vida.

Aos alunos e ex-alunos do programa de pós-graduação em Toxicologia, em especial à Lorena, ao Eric, ao Gustavo, à Cinthia, à Carina, à Marina, à Flávia, à Katia e as alunas de pós doutorado, à Cristina e à Silvana, cada bom dia de vocês me motivava a começar um dia melhor que o anterior.

Aos amigos do Instituto Butantan, principalmente à Prof^a Dr^a Vanessa Rioli e ao Prof. Dr. Osvaldo Sant'Anna, obrigada por todas as oportunidades e por acreditarem em mim, sem vocês tudo isso não seria possível, obrigada por compartilharem aprendizado comigo.

À Samantha, à Nancy, à Rose e à Cláudia, pelo empenho, dedicação e ajuda durante esse percurso.

À Dona Luzia, pelas conversas da vida, encorajamento, paciência, pelos cafés maravilhosos e principalmente pelo carinho e atenção os quais eram compartilhados entre nós.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Andrioli, T.C. **Exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal: predisposição à dependência de drogas de abuso na adolescência.** 116f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Resumo

O desenvolvimento encefálico representa um período de grande vulnerabilidade. Embora diversos trabalhos mostrem que a exposição ao fumo passivo pode levar ao desenvolvimento de sintomas psicocomportamentais da farmacodependência, ainda não está claro se a exposição à poluição tabagística ambiental (PTA) na fase inicial de formação do SNC pode levar à predisposição ao uso de drogas de abuso na adolescência. Assim, o foco deste estudo foi avaliar se a exposição à PTA no início do período pós-natal (P) contribui para a sensibilização comportamental e efeitos recompensadores ao etanol e à cocaína durante a adolescência. Camundongos machos *Swiss-Webster* foram expostos do 3º (P3) ao 15º (P15) dia de vida pós-natal, duas vezes por dia, à mistura da fumaça central e lateral de cigarros referência (3R4F). Na adolescência (P34-P45), foram avaliados os efeitos do tratamento repetido de etanol e cocaína (primeiro protocolo) como também o efeito do tratamento agudo com cocaína (segundo protocolo). No primeiro protocolo os animais foram desafiados com cocaína (i.p) ou etanol (i.p), para a avaliação da sensibilização comportamental (P34-P35) (n=6) e da preferência condicionada por lugar (*CPP*) (P36-P45) (n=6). A quantificação por *Western Blotting* (n=6) das proteínas marcadoras de plasticidade, como os receptores dopaminérgicos D1R e D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1, no estriado e no córtex pré-frontal (CPF) foi realizada imediatamente após o dia do teste da *CPP* no P45. Já para o segundo protocolo, os animais foram desafiados com cocaína (i.p) para a avaliação da sensibilização comportamental (P34-P35) (n=12), da *CPP* (n=10) e a quantificação dos mesmos marcadores bioquímicos (n=6) além da dinorfina-A, nas mesmas estruturas encefálicas que no primeiro protocolo. Essas análises foram realizadas duas horas após a expressão da sensibilização comportamental (P36). O primeiro protocolo avaliou a exposição repetida ao etanol e a cocaína na adolescência na predisposição à dependência enquanto o segundo se a exposição aguda a cocaína seria capaz de levar ao mesmo efeito. No primeiro protocolo observamos

sensibilização cruzada pela PTA e quanto ao teste da *CPP* não foi observada diferença estatística nem para o tratamento com etanol, nem para o com cocaína. Nossos resultados indicam que houve efeito estimulatório nos grupos tratados com cocaína no segundo protocolo deste estudo, representado pelo aumento da atividade locomotora após administração da droga. Por outro lado, não observamos sensibilização cruzada pela PTA, a qual foi obtida no primeiro protocolo. Já para o segundo protocolo, foi observado o condicionamento pela cocaína. Com relação à quantificação das proteínas, nosso estudo mostrou diminuição na concentração de receptores DR1 no estriado no grupo exposto à PTA e tratado com etanol em relação ao grupo controle tratado com etanol no primeiro protocolo deste estudo e sugerem que a exposição repetida ao etanol é capaz de induzir alterações nos receptores de dopamina. No segundo protocolo deste estudo observamos aumento de c-Fos no estriado e no CPF no grupo tratado com cocaína em relação ao seu controle e que a exposição aguda à cocaína é capaz de induzir aumento da dinorfina no CPF, enquanto à exposição prévia à PTA previne este aumento. Vale ressaltar que esse trabalho é inovador uma vez que avaliamos a exposição à PTA na infância e se esta poderia levar a sensibilização cruzada com a cocaína e à alterações em vias envolvidas nesse comportamento na adolescência. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a exposição à fumaça do cigarro, mesmo gerando baixas concentrações plasmáticas de nicotina e cotinina, foi capaz de produzir alterações na expressão da sensibilização comportamental, na *CPP* e alterações bioquímicas, tanto no tratamento repetido de etanol e cocaína quanto na vigência da cocaína.

Palavra chaves: *poluição tabagística ambiental; predisposição; drogas de abuso; nicotina; cocaína.*

Andrioli, T. C. **Exposure to environmental tobacco smoke in the early postnatal period: predisposition to addiction to drugs of abuse in adolescence.** 116p. Master thesis - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Abstract

The brain development represents a very vulnerable period. Although multiples studies showed that exposure to secondhand smoke during the early post-natal period induces impairment in cognitive functions and predisposition to substance dependence psychobehavioral symptoms in adolescents, there is no definitive evidences that exposure to the environmental tobacco smoke (ETS) can lead to the use of drugs of abuse. We aimed to evaluate if the exposure to ETS in the early postnatal period (P) can contribute to the behavioral sensitization and rewarding effects of ethanol and cocaine during adolescence. Using reference cigarettes (3R4F), *Swiss-Webster* male mice were exposed from the 3rd (P3) to 15th (P15) day of age, twice a day, to the mixture of the cigarettes' sidestream and mainstream. In adolescence (P34-P45), we evaluated the effects of repeated treatment with ethanol or cocaine (first protocol) and also the effect of acute treatment with cocaine (second protocol). On first protocol, animals were then challenged with cocaine or ethanol to evaluate evidence of behavioral sensitization (P34-P35) (n=6) and conditioned place preference (*CPP*) (P36-P45) (n=6). Based on *Western Blotting* analysis, we also quantified proteins markers of plasticity immediately after the day of *CPP* test (P45), in the prefrontal cortex (PFC) and striatum (dopamine receptors D₁R and D₂R, c-Fos, FRA1 and Rac1). On second protocol, animals were challenged with cocaine to evaluate evidence of behavioral sensitization (P34-P35) (n=12) and *CPP* (P36-P45) (n=10). Quantification of those markers of plasticity (n=6), plus dynorphin-A was evaluated two hours after the day of behavioral sensitization expression in P36 in PFC and striatum. The first protocol evaluated the repeated exposure to ethanol and cocaine during adolescence in the predisposition to addiction while the second protocol using acute exposure to cocaine would be able to lead to the same effect. In the first protocol we observed cross-sensitization by ETS and for *CPP* test, no significant difference for the treatment with ethanol and cocaine were observed. Our results indicated a stimulatory effect in animals challenged with cocaine on second protocol, represented by the increase in locomotors activity after drug administration.

On the other hand, we found no cross-sensitization by ETS, which was obtained in the first protocol. As for the second protocol, it was possible to observe the conditioning for cocaine. Regarding our *Western Blotting* assays, we observed that the group exposed to ETS and challenged with ethanol had decreased D₁R in the first protocol of this study. These results suggest that repeated exposure to ethanol could induce changes in dopamine receptors. In the second protocol was an increase of c-Fos in the striatum and the PFC compared to control and that acute exposure to cocaine can induce increase of dynorphin-A while the prior exposure to ETS prevents this increase on PFC. It is noteworthy that this present study is innovative since it evaluated the exposure to ETS in childhood and this could lead to cross-sensitization with cocaine and changes in pathways involved in this behavior in adolescence. Taken together, our results suggest that exposure to ETS, even findings low levels of nicotine and cotinine plasmatic was able to produce changes in the expression of behavioral sensitization in the *CPP* and biochemical changes in both the repeated treatment of ethanol and cocaine as in the acute treatment of cocaine.

Keyword: environmental tobacco smoke; predisposition; drug abuse; nicotine; cocaine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATV – Área ventral do tegmento mesencefálico

COHb – Carboxihemoglobina

CPF – Córtex pré-frontal

CPu– Caudado Putâmen

CPP – *Conditionated Place Preference* (Preferência condicionada por lugar)

CS⁺ – Compartimento pareado com a droga no teste da *CPP*

CS⁻ – Compartimento pareado com salina no teste da *CPP*

DA – Dopamina

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DR1 – Receptor dopaminérgico do tipo I

DR2 – Receptor dopaminérgico do tipo II

NAc – Núcleo Acúmbens

NAchR – Receptores Colinérgicos Nicotínicos

PTA – Poluição Tabagística Ambiental

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

SNC – Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura neuronal no receptor colinérgico nicotínico	27
Figura 2: Corte sagital representativo do encéfalo de roedor.....	28
Figura 3: Expressão gênica e as drogas de abuso	34
Figura 4: Regulação da estrutura dos dendritos pelas drogas de abuso	36
Figura 5: Fluxograma das etapas de purificação da cocaína	42
Figura 6: Desenho esquemático da exposição.....	44
Figura 7: Desenho experimental – primeiro protocolo.....	47
Figura 8: Desenho experimental – segundo protocolo	49
Figura 9: Aparato manual de preferência condicionada por lugar.....	52
Figura 10: Curva padrão de cocaína	57
Figura 11: Cromatogramas representativos da solução padrão de cocaína	58
Figura 12: Curva padrão para nicotina e cotinina.....	60
Figura 13: Avaliação da atividade locomotora total - tratamento etanol.....	62
Figura 14: Avaliação da atividade locomotora total - tratamento cocaína	63
Figura 15: Teste de preferência condicionada por lugar - dia do teste	64
Figura 16: Teste de preferência condicionada por lugar - delta teste	65
Figura 17: Teste de preferência condicionada por lugar - 5 minutos	67
Figura 18: Atividade locomotora total - tratamento cocaína	68
Figura 19: Teste comportamental de preferência condicionada por lugar - dia do teste	70
Figura 20: Análise por delta do dia do teste do teste comportamental de preferência condicionada por lugar.....	71
Figura 21: Análise por delta do dia do teste do teste comportamental de preferência condicionada por lugar dos grupos agudos	72
Figura 22: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 no estriado por <i>Western Blotting</i> no estriado - etanol	74

Figura 23: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 no estriado por <i>Western Blotting</i> no estriado - cocaína.....	76
Figura 24: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal por <i>Western Blotting</i> no córtex pré-frontal - etanol.....	78
Figura 25: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal por <i>Western Blotting</i> no estriado - cocaína	80
Figura 26: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, dinorfina-A, FRA1 e Rac1 por <i>Western Blotting</i> no estriado - cocaína	82
Figura 27: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, dinorfina-A, FRA1 e Rac1 por <i>Western Blotting</i> no córtex pré-frontal - cocaína.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação da curva padrão de cocaína.....	43
Tabela 2: Principais constituintes empregados na composição dos cigarros de referência 3R4F	43
Tabela 3: Relação dos anticorpos primários utilizados nesse projeto.....	54
Tabela 4: Concentrações reais obtidas a partir dos padrões de cocaína.....	57
Tabela 5: Valores em ppm de CO durante três dias de exposição à PTA.	59
Tabela 6: Quantificação de COHb em sangue total nos grupos controles e nos grupos expostos à PTA.....	59
Tabela 7: Valores em ng/ml dos biomarcadores nicotina e cotinina em plasma de animais expostos à PTA.	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Cenário da Poluição Tabagística Ambiental	23
1.2. Poluição Tabagística Ambiental	24
1.3. Nicotina	26
1.4. Farmacodependência	27
1.5. Testes comportamentais, sensibilização comportamental e avaliação dos biomarcadores de dependência	31
2. OBJETIVO	39
2.1. Estratégias experimentais	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Animais	41
3.2. Drogas	41
3.3. Purificação da cocaína	42
3.4. Exposição à Poluição Tabagística Ambiental	43
3.5. Marcadores biológicos da exposição	45
3.5.1. Determinação de COHb	45
3.5.2. Determinação da concentração de nicotina e cotinina em plasma	46
3.6. Desenho experimental do primeiro protocolo – Efeito do tratamento repetido de etanol e cocaína após o <i>CPP</i>	47
3.7. Desenho experimental do segundo protocolo – Efeito do tratamento agudo com cocaína	48
3.8. Análises comportamentais	50
3.8.1. Campo aberto – Avaliação da expressão da sensibilização comportamental cruzada	50
3.8.2. Preferência Condicionada por Lugar	51
3.9. <i>Western Blotting</i>	53
3.10. Análise estatística	55
4. RESULTADOS	57
4.1. Purificação da Cocaína	57
4.2. Monitorização da exposição	59
4.2.1. Monóxido de Carbono (CO)	59
4.2.2. Carboxihemoglobina	59

4.2.3. Nicotina e cotinina	60
4.3. Primeiro protocolo – Efeito do tratamento repetido de etanol e cocaína após o <i>CPP</i> 61	
4.3.1. Habituação e expressão da sensibilização comportamental em campo aberto (n=6) para o etanol	61
4.3.2. Habituação e expressão da sensibilização comportamental em campo aberto (n=6) para a cocaína	62
4.3.3. Preferência condicionada por lugar (<i>CPP</i>) para etanol e cocaína	63
4.3.3.1. Análise do dia do teste (CS^+)	63
4.3.3.2. Análise por delta do dia do teste ($CS^+_{TESTE} - CS^-_{TESTE}$)	64
4.3.3.3. Análise por delta ($CS^+_{TESTE} - CS^+_{HABITUAÇÃO}$) dos 5 minutos iniciais... 66	
4.4. Segundo protocolo – Efeito do tratamento agudo com cocaína	68
4.4.1. Habituação e expressão da sensibilização comportamental em campo aberto (n=12)	68
4.4.2. Preferência Condicionada por Lugar (<i>CPP</i>) (n=10)	69
4.4.2.1. Análise do dia do teste (CS^+_{TESTE})	69
4.4.2.2. Análise por delta do dia do teste ($CS^+_{TESTE} - CS^-_{TESTE}$)	71
4.5. Avaliação dos marcadores bioquímicos de sensibilização comportamental no estriado e no córtex pré-frontal por <i>Western Blotting</i> (n=6) para o efeito do tratamento repetido de etanol e cocaína após o <i>CPP</i> – Primeiro protocolo.....	73
4.5.2. DR1, DR2, c-Fos, FRA1 e Rac1 no estriado – Tratamento com cocaína	75
4.5.3. DR1, DR2, c-Fos, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal – Tratamento com etanol	77
4.5.4. DR1, DR2, c-Fos, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal – Tratamento com cocaína	79
4.6. Avaliação dos marcadores bioquímicos por <i>Western Blotting</i> (n=6) no tratamento agudo com cocaína – Segundo protocolo	81
4.6.1. DR1, DR2, c-Fos, dinorfina-A, FRA1 e Rac1 no estriado – Tratamento com cocaína	81
4.6.2. DR1, DR2, c-Fos, dinorfina-A, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal – Tratamento com cocaína	83
5. DISCUSSÃO	86
6. CONCLUSÕES	95

7. REFERÊNCIAS.....	97
ANEXOS.....	112

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cenário da Poluição Tabagística Ambiental

Estima-se que mais de um bilhão de pessoas no mundo fumem cigarros de tabaco e que esse número alcance 1,9 bilhões em 2025 (GUINDON; PAST, 2003). O tabaco é responsável por 5,1 milhões de mortes por ano, perdendo apenas para a hipertensão arterial, a qual representa 7,5 milhões de mortes no mesmo período (OMS, 2009). No entanto, esse número tende a aumentar para oito milhões até 2030, representando cerca de 10% de todas as causas de morte (OMS, 2010). No Brasil, um terço da população brasileira adulta é fumante, constituído por aproximadamente 11 milhões de mulheres e 16 milhões de homens, sendo que o maior número está concentrado na faixa etária dos 20 aos 49 anos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

Fumar está associado com o aumento da incidência de doença cardiovascular, incluindo doença coronariana crônica (angina, infarto do miocárdio, síndrome da morte súbita e insuficiência cardíaca congestiva), doença cerebrovascular (aneurisma da aorta e aterosclerose), e é a principal causa da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (hipersecreção de muco, interferência na função ciliar e destruição do alvéolo) (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2013). Em média, os fumantes vão a óbito 13-14 anos mais cedo do que os não-fumantes (LLOYD-JONES et al., 2010).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2013), estima-se um total de 129 mil mortes por ano devido às doenças vasculares associadas ao fumo, dos quais 80 mil por isquemia cardíaca; 21 mil por outras doenças cardíacas; 16 mil por doença vascular encefálica; 1,9 mil por aterosclerose; 8,5 mil por aneurisma da aorta e 1,3 mil por doença arterial. Em relação aos fumantes passivos, a nicotina, presente na poluição tabagística ambiental (PTA), aumenta o risco de morte súbita em decorrência de arritmias ventriculares, causando cerca de 46 mil mortes por ano.

Em um estudo brasileiro realizado por Kroeff et al. (2004), a prevalência do fumo na gestação foi em média de 32% entre mulheres residentes em 6 capitais

brasileiras. Os dados levantados foram de mulheres gestantes que procuravam atendimento em ambulatório de pré-natal em hospitais públicos credenciados para o projeto nas cidades de Manaus (AM), Fortaleza (CE), Salvador (BA), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP) e Porto Alegre (RS).

Estudos epidemiológicos mostram que fumar ou se expor à PTA durante a gestação pode levar a mudanças no desenvolvimento neuronal e no comportamento, reduzindo assim a capacidade intelectual, o que pode acarretar déficit de atenção e hiperatividade (ESKENAZI; CASTORINA, 1999); (GOODWIN et al., 2014).

Godding et al. (2004) encontraram baixos escores neurológicos em neonatos de mães que fumaram durante a gestação quando comparados com os de não fumantes e também concluíram a possibilidade de ocorrer sintomas de síndrome de abstinência em recém-nascidos que foram expostos ao fumo materno durante a gestação (GODDING et al., 2004). Esses resultados corroboram o estudo de Law et al. (2003), que avaliaram os efeitos neurotóxicos do fumo no feto, e encontraram uma relação dose-resposta entre as concentrações de cotinina salivar da mãe e sinais de abstinência (estresse), como maior excitabilidade e hipertonia. Diante desses resultados, os autores concluíram que os efeitos neurotóxicos do tabaco interferem no comportamento neurológico do recém-nascido (LAW et al., 2003).

Embora os maiores benefícios para o desenvolvimento fetal ocorram se a suspensão do tabagismo ocorrer ainda no início da gestação, a interrupção em qualquer momento da gravidez, ou mesmo no pós-natal, tem significativo impacto na saúde da família. A manutenção da abstinência no decorrer da gestação e no pós-parto tem papel fundamental na prevenção de doenças materno-infantis relacionadas ao tabaco, sendo associada ao ganho de saúde da mãe, do feto e da criança (LEOPÉRCIO; GIGLIOTTI, 2003).

1.2. Poluição Tabagística Ambiental

A PTA é uma mistura complexa contendo mais de 6.100 substâncias químicas, tornando-se difícil determinar a contribuição toxicológica global de cada substância, bem como os mecanismos moleculares pelos quais a fumaça exerce seus efeitos biológicos (RODGMAN; PERFETTI, 2013). É formada pela

fumaça central (10-20%), a qual é tragada e expelida pelo fumante, e a lateral (80-90%), produzida pela ponta acesa do cigarro (96% do tempo da queima do cigarro). Um fato importante é que a fumaça lateral é mais tóxica e apresentam concentrações mais elevadas de nicotina, monóxido de carbono, amônia, aldeídos e substâncias cancerígenas (MELLO et al., 2005).

Diferentes métodos e indicadores têm sido propostos para o monitoramento biológico de indivíduos expostos à PTA. A dosagem de carboxihemoglobina (COHb) no sangue ou CO no ar expirado, além de nicotina, tiocianato e a cotinina, principal metabólito da nicotina, mensurados no plasma, saliva ou urina são os indicadores mais conhecidos (MELLO et al., 2005). O CO inalado liga-se à hemoglobina, dando origem à COHb, que apresenta meia-vida de aproximadamente 5-6 horas em humanos, podendo permanecer no sangue por até 24 horas dependendo de uma série de fatores, como ventilação pulmonar e atividade física. Apesar de existirem outras causas de exposição ao CO, como a poluição ambiental, o tabagismo passivo e a exposição ocupacional, a causa mais frequente de altas concentrações de COHb decorre do tabagismo ativo (VESLEY et al., 1999).

A COHb em fumantes depende de vários fatores como a intensidade da tragada e o número de cigarros fumados e permanece praticamente constante ao longo do dia, já que sua meia-vida em humanos é de 3 horas e os fumantes têm o hábito de fumar periodicamente. Já em camundongos, a COHb possui meia-vida de 30 minutos devido a ligação lábil entre o CO e a hemoglobina desses roedores (MELLO et al., 2005).

A PTA é um risco para a saúde não apenas para os fumantes, mas também para os fumantes passivos, principalmente para as crianças (DURANTE et al., 2013; JOYA et al., 2014). Trabalhos anteriores de nosso grupo mostram que a exposição de camundongos à PTA no início do período pós-natal induz estresse oxidativo em diferentes regiões encefálicas (TORRES et al., 2012), além de danos ao processo de mielinização no nervo óptico e diminuição das proteínas Olig-1 e proteína básica de mielina (TORRES et al., 2014). Ainda, foi observado que a exposição de camundongos à PTA, durante esta fase crítica do desenvolvimento, causa diminuição de proteínas sinápticas no hipocampo e prejuízos ao processo de aprendizagem e memória na infância, na adolescência e na fase adulta (TORRES et al., 2015). Em conjunto, estes resultados sugerem

que a PTA causa prejuízos não só no início do desenvolvimento, mas também em longo prazo. Vaglenova et al. (2004) avaliaram os efeitos da nicotina isoladamente e seus resultados sugerem que a exposição pré-natal à nicotina causa danos ao crescimento pré e pós-natal, além de déficits comportamentais durante a infância e a adolescência de ratos Sprague-Dawley. Os autores avaliaram os efeitos da exposição pré-natal à nicotina e observaram que os animais mostraram retardo no crescimento, hiperatividade, dificuldade de adaptação a um novo ambiente, aumento da ansiedade durante o início da adolescência e deficiência cognitiva quando adultos.

1.3. Nicotina

A maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos mostram que a nicotina é o principal agente responsável pelo desenvolvimento da dependência ao tabaco (STOLERMAN; JARVIS, 1995). A nicotina é o principal alcaloide encontrado no tabaco, sendo uma base fraca e de natureza lipofílica, prontamente absorvida por membranas (BENOWITZ, 1990).

A nicotina exerce sua ação farmacológica ligando-se a receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) (PICCIOTTO et al., 2013), conforme ilustrado na Figura 1. Esses receptores são pentâmeros compostos por diferentes combinações de cadeias de polipeptídios, denominadas α e β e estão presentes no sistema nervoso central (SNC). Diferentes combinações dessas subunidades estão dispostas na membrana celular formando um canal iônico. A ligação da nicotina com esses receptores promove alterações conformacionais e abertura desses canais, promovendo o influxo de cátions (Na^+ e Ca^{2+}). A nicotina exerce seus efeitos interagindo com nAChRs pré-sinápticos localizados nos terminais dos axônios. A estimulação desses receptores resulta no aumento da liberação de vários neurotransmissores (PICCIOTTO et al., 2000).

No SNC, os nAChRs são formados pela combinação homopentamérica ou heteropentamérica das subunidades α_{2-10} e β_{2-4} . Estudos demonstram que os principais nAChRs relacionados aos comportamentos de dependência ao tabaco são os $\alpha_4\beta_2$, os homoméricos α_7 e os receptores que contém a subunidade α_5 (PICCIOTTO et al., 2000).

Figura 1: Estrutura neuronal no receptor colinérgico nicotínico (nAChR). (A): cada subunidade do nAChR contém 4 domínios transmembrânicos (M1-M4) e uma terminação extracelular amino (N) e carboxi (C). (B): cinco subunidades são necessárias para formar uma subunidade funcional. (C): receptores homoméricos são constituídos de subunidades α e usualmente possuem baixa afinidade para agonistas. (D): a maior parte dos nAChR de alta afinidade são heteroméricos e constituem uma combinação de subunidades α e β . Os triângulos vermelhos representam sítios de ligação para a acetilcolina. Adaptado de PICCIOTTO et al., 2000.

1.4. Farmacodependência

Robinson e Beridge (1993) propuseram que todas as substâncias que induzem dependência, incluindo a nicotina, têm em comum a propriedade de causar efeitos euforizantes ou prazerosos e, dessa forma, atuam como reforçadores positivos, que podem levar à sensibilização comportamental.

O efeito reforçador positivo das drogas de abuso é decorrente da ativação de um substrato neurobiológico comum, o sistema dopaminérgico meso-corticolímbico (Figura 2) (WISE; BOZARTH, 1987; ROBINSON; BERIDGE, 1993). Esse sistema é parte do sistema de recompensa e tem como principais componentes a área ventral do tegmento mesencefálico (ATV) composta por sítio de corpos celulares de neurônios dopaminérgicos e suas projeções para regiões do sistema límbico incluindo o núcleo acúmbens (NAc), o tubérculo olfativo, a amígdala e o córtex pré-frontal e límbico (KOOB; LE MOAL, 2001).

Figura 2: Corte sagital representativo do encéfalo de roedor ilustrando os sistemas de vias e receptores relacionados ao reforço agudo das drogas de abuso. A nicotina ativa receptores colinérgicos nicotínicos na ATV, NAc, amígdala, tanto direta quanto indiretamente, com liberação de dopamina por meio de interneurônios. A cocaína ativa a liberação de dopamina no NAc e amígdala por meio de estimulações nos terminais dopaminérgicos. O etanol, dependendo da dose, pode agir em receptores gabaérgicos pré-sinápticos controlando a regulação de glutamato, liberando dopamina e resultando em efeitos excitatórios, como agindo em receptores pós-sinápticos agindo tanto em receptores gabaérgicos quanto em glutamatérgicos, principalmente o NMDA, deprimindo o SNC. O etanol facilita a liberação de peptídeos opióides na ATV, NAc e no núcleo central da amígdala. O etanol facilita a liberação de dopamina tanto na ATV quanto no NAc por meio de canais ligante-dependentes, agindo como agonistas de receptores GABA_A e antagonistas de receptores NMDA. As setas em vermelho compõem o sistema dopaminérgico meso-corticolímbico ou sistema de recompensa, composto por inervações para a ATV, NAc e córtex pré-frontal. CA, comissura anterior; AMG, amígdala; ARC, núcleo arqueado; NB, núcleos da base; CER, cerebelo; CPu, caudado-putâmen; CPF, córtex pré-frontal; HIP, hipocampo; LC, locus cerúleo; HL, hipotálamo lateral; N.Ac., núcleo acúmbens; OT, trato olfatório; RPn, núcleos reticulares da ponte; SNr, substância negra reticulada; VP, pálido ventral; ATV, área ventral do tegmento mesencefálico (Adaptado de KOOB, 2005).

O aumento da concentração de dopamina no NAc parece ser um mecanismo comum de todas as drogas que induzem dependência (WISE; BOZARTH, 1987), tais como nicotina, cocaína, anfetamina, morfina (DI CHIARA et al., 1988), etanol (KILIANMAA et al., 1995) e delta-9-THC (TANDA et al., 1997).

Outra característica das drogas que levam à dependência é a ocorrência da síndrome de abstinência após a sua retirada e seus possíveis mecanismos

de sinalização celular. Sabe-se que a cocaína, entre outras inúmeras ações, exerce seus efeitos nos sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos, e também age como agonista indireto dos receptores de dopamina, por meio da inibição dos transportadores de dopamina. Seus alvos moleculares são as proteínas G inibitória (G_i) e estimulatória (G_s), sendo que o receptor D_2 de dopamina se acopla à proteína G_i enquanto o receptor D_1 de dopamina se acopla a proteína G_s . Essas ações em alvos moleculares e em neurotransmissores podem contribuir para os seus efeitos reforçadores. Já o etanol possui ação agonista de receptores $GABA_A$ e antagonistas de receptores NMDA, e seus alvos moleculares são principalmente canais ligante-dependente (NESTLER, 2001). Entretanto, os sinais e sintomas da síndrome de abstinência, com exceção da fissura, são específicos para cada droga (ou classe de drogas) e, portanto, podem ser mediados pela neuroadaptação de sistemas neurais distintos (PICCIOTTO, 1998).

Embora o tabaco produza estados euforizantes moderados, usuários de cocaína frequentemente identificam os efeitos da administração intravenosa de nicotina como sendo similares ou idênticos àqueles da injeção de cocaína. Essa observação sugere que os efeitos reforçadores de ambas as substâncias sejam mediados por sítios anatômicos e mecanismos neurais semelhantes, embora essas substâncias, primariamente, interajam com componentes moleculares distintos no SNC (HENNINGFIELD et al., 1993).

O efeito reforçador positivo das drogas de abuso, como cocaína, delta-9-THC, opioides e etanol, tem sido amplamente demonstrado em modelos experimentais baseados nos princípios do condicionamento clássico (preferência condicionada por lugar) ou operante (auto-administração) (BOZARTH, 1990; LEPORE et al., 1995; PLANETA et al., 1995 ; TANDA et al., 2000).

Esses modelos comportamentais também têm sido utilizados para demonstrar o efeito recompensador da nicotina. Ela é capaz de induzir a preferência condicionada por lugar em ratos e camundongos (RISINGER; OAKES, 1995; SHOAI B et al., 1994), ou seja, pareamentos repetidos da nicotina com um determinado compartimento fazem com que o animal permaneça mais tempo nesse compartimento no dia do teste, que é realizado na ausência da droga. Isso implica que o ambiente pareado com a nicotina adquiriu as

características de um estímulo condicionado devido à associação com o efeito recompensador dessa substância (SHOAIB et al., 1994).

Recentemente, foi demonstrado que drogas psicoativas como etanol, anfetamina, cocaína e nicotina, podem alterar a formação do córtex pré-frontal durante o seu desenvolvimento, assim como na idade adulta (KOLB et al., 2012). Sabe-se que o desenvolvimento do encéfalo continua durante a adolescência e vai até o início da idade adulta e, nesta fase, ele é altamente influenciado por alterações plásticas adaptativas dependentes de experiências. Em relação ao comportamento, este período é também caracterizado por um aumento da busca por novidade e da exposição a riscos. Esta alta plasticidade parece ser importante nos processos de formação do comportamento e da cognição, que contribuirão para compor características que persistirão durante a idade adulta (CARPENTER-HYLAND; CHANDLER, 2007). Em adolescentes, as vias dopaminérgicas, principalmente no córtex pré-frontal, são imaturas e estão em processo de desenvolvimento. O etanol, a cocaína e a nicotina agem em vias dopaminérgicas, ativando a via meso-corticolímbica (o que pode levar à dependência e comportamentos baseados em reforço) e a via nigro-estriatal (condicionamento sensório-motor baseado em recompensa e a respostas motoras a drogas de abuso) (ROBINSON; BECKER, 1986; KALIVAS; STEWART, 1991).

Existe uma relação bem documentada entre o tabagismo e uso de drogas de abuso (BELANGER et al., 2011). Um grande número de estudos têm relatado ligações entre o tabagismo e o início do uso dessas substâncias, conceituando o tabagismo como uma "porta de entrada" para o uso de drogas de abuso (BELANGER et al., 2011; BIEDERMAN et al., 2006; GRAY et al., 2011; KANDEL, 2002; LOG et al., 2011; TIMBERLAKE et al., 2007). Usuários de drogas começam a fumar no começo da adolescência e continuam por longos períodos, tornando-se mais dependentes à nicotina (AGRAWAL et al., 2008; DE DIOS et al., 2009).

A cocaína produz efeitos generalizados na estrutura neuronal por meio do sistema de recompensa no encéfalo, sendo que estas estão possivelmente envolvidas nas mudanças comportamentais em longo prazo (THOMAS et al., 2008; ROBINSON et al., 2001; LUSCHER et al., 2008). Por exemplo, a exposição repetida à cocaína aumenta o número e a densidade dos espinhos

dendríticos em regiões do encéfalo envolvidas em recompensa, como o NAc e o córtex pré-frontal (LEE; KIRKWOOD, 2011; NORRHOLM et al., 2003; ROBINSON et al., 2001; RUSSO et al., 2009). Essas mudanças na morfologia dendrítica podem ser fortes evidências para explicar como a cocaína pode induzir alterações comportamentais, alterações na plasticidade e na dependência (ROBINSON; KOLB, 1999).

1.5. Testes comportamentais, sensibilização comportamental e avaliação dos biomarcadores de dependência

O comportamento representa uma relação entre a fisiologia e o ambiente externo e, portanto, variações fisiológicas podem induzir comportamentos específicos e previsíveis (WEBER, 1997).

Estudos neurocomportamentais podem ser úteis na avaliação dos efeitos da exposição prolongada às substâncias químicas. Por exemplo, o sistema de monitoramento da atividade por meio do campo aberto permite de forma abrangente avaliar os níveis de atividade locomotora e comportamental em roedores, as quais podem ser correlacionadas com a função locomotora (TATEM et al., 2014). A sensibilização comportamental é caracterizada pelo aumento da atividade locomotora após exposição repetida a psicoestimulantes e outras drogas de abuso (ROBINSON; BERRIDGE, 2000).

Já a preferência condicionada por lugar (*CPP*) é um modelo para estudo das propriedades de condicionamento da droga, permitindo avaliar o efeito reforçador da droga, desejo, recaída como também presença ou ausência do efeito (PILDERVASSER et al., 2014). Em humanos, a associação entre os efeitos de recompensa de uma droga e um determinado estímulo ambiental tem importantes implicações no potencial de abuso das drogas que podem levar à dependência (ROBBINS; EHRMAN, 1992).

Processos de aprendizagem associativa, ou seja, a associação do efeito da droga com um contexto, modulam comportamentos relacionados com a droga (ROBINSON et al. 1998; STEWART; VEZINA, 1991).

Embora detalhes na metodologia diferenciem-se entre os grupos de pesquisa, um experimento clássico da *CPP* inclui pareamentos de conjuntos distintos de estímulos: estímulos do ambiente (dependente do contexto) com

estímulos de interesse (droga, alimento, oportunidade copulatória). Essas pistas ou estímulos contextuais variam, e podem ser, por exemplo, diferentes tipos de pisos, tamanho ou forma de uma superfície, cor da parede ou padrão de cores, até mesmo pistas olfativas. O condicionamento está relacionado com o comportamento animal frente a diferentes estímulos (estímulo não condicionado ou *US*) dependentes do contexto ou do ambiente de escolha (estímulo condicionado ou *CS*). Na maioria dos testes de *CPP*, pesquisadores supõem que o contexto (inicialmente um estímulo neutro) passe a ser um estímulo condicionado em decorrência da sua associação com a droga (estímulo não condicionado) por meio do processo de condicionamento pavloviano clássico (BARDO; BEVINS, 2000).

É importante considerar que nem todos os animais expostos a uma droga de abuso necessariamente desenvolverão dependência (DEROCHE-GAMONET et al., 2004). A questão-chave que permanece sem resposta é por que isso ocorre e uma possível explicação pode estar relacionada à significativa variabilidade individual nas respostas a adaptações comportamentais e biológicas induzidas pela exposição crônica às drogas (PILDERVASSER et al., 2014).

A sensibilização comportamental em roedores pode ser definida como um aumento do efeito de uma substância em decorrência de sua administração repetida. Uma característica comum das substâncias que levam à dependência é o aumento gradual e progressivo da atividade locomotora observado após sua administração repetida, esse fenômeno é conhecido como sensibilização comportamental (POST; ROSE, 1976; ROBINSON; BECKER, 1986).

De acordo com Robinson e Berridge (1993; 2001), além de mediar a sensação subjetiva de prazer, a dopamina regula o impulso motivacional e a atenção aos estímulos salientes, incluindo os estímulos reforçadores. A sensibilização torna os estímulos (uso da droga e comportamentos relacionados) altamente salientes, atrativos e desejados. A sensibilização resulta em um aumento patológico da relevância que o SNC atribui ao ato de usar a droga. Assim, com o uso repetido, a droga e os estímulos associados tornam-se progressivamente mais atrativos e capazes de controlar o comportamento. Dessa forma, desenvolve-se a fissura pela droga e seu uso compulsivo.

Sensibilização é uma manifestação relativamente simples de aprendizado e memória que se relaciona de uma forma geral, ao aumento de um determinado efeito de uma substância em resposta a um estímulo e é evidenciada no caso das substâncias que causam dependência.

A sensibilização comportamental é, portanto, um outro parâmetro relacionado à dependência e que pode ser alterado pela administração de outras drogas ou até mesmo à episódios de estresse. Por exemplo, alguns estudos evidenciam que ratos adultos expostos a diferentes tipos de estresse, natação forçada, choque nas patas, imobilização, privação de alimento ou estresse social apresentam aumento da atividade locomotora quando foram tratados com cocaína ou anfetamina (BADIANI et al., 1992; ROUGÉ-PONT et al., 1995; PRASAD et al., 1998; HAILE et al., 2001; DE JONG et al., 2005). Esse fenômeno evidencia a sensibilização comportamental cruzada entre estresse e psicoestimulantes. Segundo Stewart e Badiani (1993), a sensibilização cruzada refere-se ao fenômeno em que ocorre um pré-tratamento com uma determinada droga e esta resulta na sensibilização para os efeitos comportamentais de outra droga.

Um dos mecanismos pelos quais as drogas induzem a sensibilização é por meio de alterações da expressão gênica neuronal. A autoadministração de cocaína ou nicotina produz aumento transitório de proteínas da família Fos e outros fatores relacionados ao gene *c-fos*, como o FRA's no NAc (PICH et al., 1997). Vale mencionar que o *c-fos* é um fator de transcrição o qual permite que proteínas se liguem às regiões regulatórias dos genes e com isso aumentem ou diminuam a transcrição gênica, processo este que pode ser observado de uma maneira geral na Figura 3. Tais alterações na transcrição gênica regulam os efeitos a curto e longo prazo de drogas de abuso no encéfalo (NESTLER, 2002) e os principais representantes de uma família de genes de expressão imediata compreende FRA-1, FRA-2 e $\Delta fosB$ (COHEN; CURRAN, 1988; NESTLER, 2002; NISHINA et al., 1990).

Figura 3: Expressão gênica e as drogas de abuso. A taxa de expressão de um gene em particular é controlada pela sua localização no nucleossomo e sua atividade durante a transcrição. Fatores de transcrição se ligam a sítios específicos que estão presentes em certas regiões dos genes, deste modo aumentando ou diminuindo a taxa pelos quais eles são transcritos. A regulação dos fatores de transcrição é a melhor forma de compreender os mecanismos de expressão gênica que ocorrem no sistema nervoso adulto. Muitos fatores de transcrição são regulados por fosforilação. Assim, alterações repetidas na transmissão sináptica e consequentemente nas proteínas quinases ou fosfatases poderiam gerar mudanças na fosforilação e particularmente em fatores de transcrição como CREB que são expressos sob condições basais, que pode alterar a expressão de genes alvo. Entre esses genes estão outros fatores de transcrição (como *c-fos*), os quais, por meio de alterações em suas concentrações, podem alterar a expressão de outros genes alvos e a administração de drogas de abuso podem provocar mudanças estáveis a longo prazo na função neural. Adaptado de NESTLER, 2001.

Os marcadores comuns *c-fos* e FRA's, utilizados para avaliar a dependência a muitas drogas de abuso, como a nicotina e a cocaína, formam

heterodímeros com membros da família do fator de transcrição Jun, originando o complexo AP1 (proteína ativadora-1), o qual é regulador da transcrição gênica neuronal (NESTLER, 2002). Alguns FRA's são proteínas estáveis que podem induzir alterações duradouras nas células nervosas, promovendo o processo de neuroadaptação que contribui para o desenvolvimento da dependência (HOPE et al., 1994).

A elevação dos níveis da proteína c-Fos, cujo pico se dá duas horas após o estímulo periférico, altera opioides no encéfalo como a encefalina e a dinorfina. Há modesta elevação de RNAm de pré-pró-encefalina e um grande aumento dos níveis de RNAm de pré-prodinorfina, sendo o pico de ambos após três horas do tratamento com algumas drogas de abuso, por exemplo, a cocaína (IADAROLA et al., 1988). Porém, apenas o peptídeo da dinorfina sofre aumento subsequente de seus níveis (IADAROLA et al., 1988; WEIHE et al., 1989). Além disso, neurônios que apresentam imunorreatividade semelhante à da proteína c-Fos (FLI ou *c-fos-protein-Like Immunoreactivity*) têm a mesma localização de neurônios que expressam pré-prodinorfina ou pré-proencefalina (NOGUCHI et al., 1991; 1992). Tal observação tem sido aceita como uma evidência de que o sinal da proteína c-Fos está acoplado à transcrição dos genes de dinorfina e encefalina. Aliada a esses fatos, a presença de um sítio de ligação AP-1, na região promotora do gene da pré-prodinorfina, e a demonstração de que as proteínas da família Fos e Jun se ligam a esse sítio, nos genes de pré-prodinorfina (NARANJO et al., 1991) e pré-proencefalina de ratos (SONNEMBERG et al., 1989), corroboram essa hipótese.

Apesar de alguns estudos associarem a transcrição gênica à plasticidade sináptica no NAc (EDWARDS et al., 1999; SHEN et al., 2009; TODA et al., 2006; YANG et al., 1998), os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não estão claros, principalmente em relação à alteração que a cocaína poderá causar nesses fatores de transcrição.

Em outros sistemas, a regulação da transferência de actina é governada em grande parte por pequenas GTPases (HALPAIN, 2000), particularmente a família Rho, que inclui Rac1, RhoA e CDC42 (PENZES; JONES, 2008). A Rac1 está envolvida na remodelação dendrítica em neurônios corticais e hipocampus (OH et al., 2010; LUO et al., 1996), sendo que a ativação da Rac1 regula a reorganização do citoesqueleto, pelo menos em parte, por meio da modulação

pela cofilina, fator de despolimerização de actina (YANG et al., 1998; EDWARDS et al., 1999). Os espinhos dendríticos são altamente plásticos e dinâmicos, sendo que o crescimento e a retração espinhal estão envolvidos na plasticidade sináptica em muitos sistemas neurais (SHEN et al., 2009; TODA et al., 2006; 2010). A exposição repetida à cocaína aumenta transitoriamente a quantidade de cofilina ativa, o que leva a um aumento das ramificações dendríticas dos neurônios no NAc, aumentando assim a quantidade de actina no mesmo (EDWARDS et al., 1999; YANG et al., 1998). Apesar desses estudos, não existem dados que correlacionem diretamente a sinalização Rac1 à plasticidade do espinho dendrítico induzida pela cocaína no NAc (DIETZ et al., 2012). No entanto, diversos estudos correlacionaram diretamente a baixa regulação da sinalização da Rac1 e a atividade da cofilina reforçada no NAc a uma maior sensibilidade para os efeitos de recompensa da cocaína (MIYAMOTO et al., 2006; SHEN et al., 2009; SHIRAZI et al., 2010; TODA et al., 2006). A Figura 4 mostra de uma forma geral a regulação da formação dos espinhos dendríticos pelas drogas de abuso.

Figura 4: Regulação da estrutura dos dendritos pelas drogas de abuso. Ocorre expansão da árvore dendrítica após exposição crônica às drogas de abuso no NAc e no córtex pré-frontal. As áreas ampliadas mostram um aumento dos espinhos dendríticos, o qual se postula que ocorra em conjunto com a ativação de terminais nervosos. Essas alterações na estrutura dos dendritos, as quais são semelhantes àquelas observadas em outros exemplos de plasticidade sináptica, podem mediar respostas de longa duração devido à sensibilização pelas drogas de abuso ou estímulos ambientais. Adaptado de NESTLER (2001).

A dopamina e o glutamato são um dos principais reguladores da plasticidade neuronal que estão relacionadas à dependência (SUN et al., 2005; HAMILTON et al., 2010; REN et al., 2010; MARTIN et al., 2011). Exposição repetida à cocaína provoca um aumento na concentração de dopamina, resultando em alterações a longo prazo na morfologia dos dendritos em áreas de recompensa do encéfalo, como o córtex pré-frontal (KAUER; MALENKA, 2007; ROBINSON; KOLB, 2004).

Prever as consequências da exposição a substâncias tóxicas tem sido um grande desafio no campo da toxicologia (BHATTACHARYA et al., 2011). Cerca de 40% das crianças no mundo são expostas ao fumo passivo (SAMET; YOON, 2001), mas até o momento não está claro se essa exposição pode predispor ao uso de drogas de abuso na adolescência. Vale ressaltar que estudos com este enfoque são importantes para direcionar políticas públicas que visem à prevenção dos danos causados pelo fumo passivo.

Objetivo

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal de camundongos colaborou para a predisposição à sensibilização e aos efeitos recompensadores da cocaína e do etanol, durante a adolescência.

2.1. Estratégias experimentais

a) Avaliação da predisposição foi realizada por meio dos seguintes testes comportamentais:

- i. Sensibilização comportamental à cocaína e ao etanol por meio da análise da atividade locomotora total em campo aberto;
- ii. Preferência condicionada por lugar após repetidas administrações de cocaína e etanol.

b) Quantificação de receptores dopaminérgicos (D1R e D2R), c-Fos, FRA1, dinorfina-A e Rac1 no estriado e no córtex pré-frontal por meio de *Western Blotting* na ausência e na presença do tratamento com etanol e com cocaína.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

O projeto foi previamente aprovado pelas comissões de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA – protocolo número 478 – ANEXO 1). Camundongos machos e fêmeas da linhagem *Swiss-Webster* de 6-8 semanas provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas foram mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro, com água e comida à vontade, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $55 \pm 10\%$, trocas de ar 15-20 trocas/hora.

Para os experimentos de exposição da poluição tabagística ambiental (PTA) os filhotes machos e fêmeas foram expostos do 3º ao 15º dia de vida pós natal (P) acompanhados de suas mães. Em P15 as mães e os filhotes fêmeas (n=6) foram utilizados para os experimentos de monitorização da carboxihemoglobina, nicotina e cotinina. Em P21 foi realizado o desmame e os machos da mesma ninhada foram separados e distribuídos em um número de cinco por gaiola.

Para os testes comportamentais de campo aberto e de preferência condicionada por lugar (CPP) os animais machos provinham de quatro ninhadas diferentes, sendo que para evitar alterações nos testes comportamentais os mesmos foram divididos entre os grupos de interesse.

3.2. Drogas

Foram utilizados etanol 20% (v/v) (Merk do Brasil S. A., Rio de Janeiro, R. J. Brasil®) na dose 2,0 g/kg (CARRARA-NASCIMENTO et al., 2014) e cocaína 10,0 mg/Kg (CAMARINI et al., 2008), a qual foi gentilmente cedida pelo Núcleo de Exames de Entorpecentes do Instituto de Criminalística de São Paulo, para fins de pesquisa do Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.3. Purificação da cocaína

Como a cocaína cedida pela Polícia Científica é obtida a partir de apreensões de rotina, a primeira etapa foi realizar a purificação das amostras cedidas. A cocaína foi purificada em nosso laboratório para a eliminação dos interferentes de acordo com o fluxograma observado na Figura 5.

Figura 5: Fluxograma das etapas de purificação da cocaína obtida a partir de apreensões pela Polícia Científica de São Paulo.

Após o processo de purificação, a identificação e quantificação do cloridrato de cocaína foram realizadas pelo método de cromatografia em fase gasosa (Agilent Technologies 6890N) acoplada a um detector de nitrogênio/fósforo (CG-NPD). As condições cromatográficas empregadas foram: temperatura de 270 °C no injetor, fluxo de 10 ml/minuto, nitrogênio como gás de arraste, temperatura inicial de 148 °C no forno, com corrida de 1 minuto. Ainda nas condições do forno, foram

empregadas duas rampas: rampa 1 (200 °C, taxa de 10 °C/minuto), rampa 2 (270 °C, taxa de 20 °C/minuto e corrida de 7 min), com corrida total de 16,7 min. O detector estava ajustado à 280 °C, com fluxo de H₂ (3 ml/minuto) e fluxo de ar de 60 ml/minuto. A coluna utilizada foi uma Ultra 2 (5% fenil metil siloxano) medindo 25 m x 200 µm x 0,33 µm, volume de injeção de 2 µL e fluxo de 0,7 ml/minuto.

Inicialmente uma curva padrão de cocaína foi preparada a partir de uma solução de 1 mg/ml de cocaína padrão (*Cerilliant*[®]) de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Determinação da curva padrão de cocaína por cromatografia em fase gasosa.

Concentração de cocaína (µg/ml)	Volume da solução 1 mg/ml (µL)	Volume de difenilamina* (µL)	Volume de metanol (µL)	Volume final (µL)
100	2	10	8	20
250	5	10	5	20
500	10	10	0	20

*Difenilamina: padrão interno (solução de 50 µg/ml)

A partir da curva padrão obtida foi determinada a concentração real dos padrões empregados na montagem da curva (correção de erro de pipetagem, erro de analista e qualidade do padrão empregado), bem como a porcentagem de pureza da amostra de cocaína, a qual foi utilizada nos testes comportamentais.

3.4. Exposição à Poluição Tabagística Ambiental

Os filhotes machos de camundongos da linhagem *Swiss-Webster* foram expostos, acompanhados de suas mães, à fumaça do cigarro 3R4F (cigarros referência, desenvolvidos pela Universidade de Kentucky, EUA) de P3 a P15. Os principais constituintes do cigarro de referência 3R4F podem ser verificados na Tabela 2.

Tabela 2: Principais constituintes empregados na composição dos cigarros de referência 3R4F (Universidade de Kentucky, EUA).

Principais constituintes	Quantidade (mg/cigarro)
Nicotina	0,726
Alcatrão	9,4
Monóxido de Carbono	11,9

Fonte: ROEMER et al, 2012.

A exposição à fumaça do cigarro ocorreu em dois horários, 8:00 e 16:00h, com duração de uma hora cada, em uma câmara de polipropileno (564 mm x 385 mm x 371 mm) dentro de uma capela. Na câmara havia quatro aberturas, sendo uma para a entrada de ar comprimido, a segunda para a fumaça lateral produzida pela queima da ponta acesa do cigarro, a terceira para a fumaça central produzida pelo Sistema Venturi e a última para a troca com o ambiente. Os animais do grupo controle foram colocados em uma câmara semelhante e inalaram apenas ar sintético da Empresa Air Products Brasil Ltda., sendo constituído de: O₂ 19,9% (V), H₂O 3ppm (V), hidrocarbonetos totais 0,5 ppm (V) e dióxido de carbono + monóxido de carbono 1,0 ppm (V), com pureza total de 99,998% (V).

A fumaça central foi produzida pelo sistema Venturi, o qual está esquematicamente representado na Figura 6, bem como o esquema da exposição à PTA.

Figura 6: Desenho esquemático da exposição com destaque na construção do sistema Venturi utilizado na exposição à PTA.

O sistema Venturi é constituído por uma tubulação suavemente cônica, e nesse sistema o fluxo laminar de ar comprimido passa de uma região de maior diâmetro para uma de menor diâmetro. Com isso, há aceleração do fluxo de ar e

consequente redução da pressão nesse ponto (efeito Venturi), permitindo que a fumaça do cigarro seja aspirada. Assim, a entrada para a fumaça central é composta por uma mistura de ar comprimido e da fumaça do cigarro.

Em cada hora de exposição eram utilizados sete cigarros, sendo quatro cigarros centrais e três cigarros laterais. Portanto, durante os 13 dias de exposição foram utilizados 182 cigarros de referência 3R4F. A quantidade de CO presente na fumaça inalada pelos animais foi monitorada a cada 10 minutos por meio de um detector de gases específico (Honeywell, IQ ForceTM).

3.5. Marcadores biológicos da exposição

A COHb, a nicotina e a cotinina foram utilizadas como marcadores biológicos da exposição.

3.5.1. Determinação de COHb

A COHb foi quantificada em sangue total por meio de método espectrofotométrico previamente otimizado em nosso laboratório (BEUTLER; WEST, 1984).

O princípio do método consiste na redução da hemoglobina com ditionito de sódio formando hemoglobina reduzida (Hbred), a desoxihemoglobina. Este agente reduz todas as formas de hemoglobina (metemoglobina e a oxihemoglobina), exceto a COHb. Os fatores de calibração devem ser calculados para cada espectrofotômetro e, no caso, os fatores obtidos em nosso equipamento por TORRES et al. (2012) foram: F1: 1,2814; F2: 0,7672 e F3: 1,9170 (BEUTLER; WEST, 1984; MALHEIRO, 1991). A técnica utilizada no estudo está descrita a seguir.

a) Determinação da porcentagem de COHb

Em um tubo de teste com tampa adicionou-se 0,1 ml de sangue total e 12 ml de solução hemolisante. Após homogeneização por inversão, a solução foi deixada em repouso por 10 minutos. Então, 0,2 ml do hemolisado foram diluídos com 2,3 ml de solução redutora. A solução foi tampada e deixada à temperatura ambiente por

10 minutos. Em seguida a leitura espectrofotométrica foi realizada em 420 e 432 nm, utilizando como branco a solução redutora. A fórmula utilizada para o cálculo da % de COHb é descrita abaixo:

$$\% \text{ COHb} = \frac{1 - (\text{AR} \times \text{F1})}{\text{AR} (\text{F2} - \text{F1}) - \text{F3} + 1} \times 100 \quad \text{Sendo: } \text{AR} = \frac{\text{Abs } 420}{\text{Abs } 432}$$

3.5.2. Determinação da concentração de nicotina e cotinina em plasma

A nicotina e a cotinina foram quantificadas em plasma, por cromatografia em fase gasosa (Agilent Technologies 6890N) com detector de nitrogênio/fósforo (CG-NPD), conforme MAN et al. (2006) e TORRES et al. (2012). Entretanto, algumas alterações no método foram realizadas. Houve modificação da concentração final do padrão interno (prolintano) de 1 µg/ml para 5 µg/ml, bem como alteração do volume de injeção no cromatógrafo de 2,0 µL para 5,0 µL. Foram utilizados 150 µL de plasma diluído em 150 µL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0. O padrão interno utilizado foi o prolintano, previamente diluído em metanol, em uma concentração final de 1 µg/ml. As amostras foram submetidas à microextração em fase sólida com cartucho SPE BOND ELUT CERTIFY 130 mg (VARIAN) previamente condicionados com 2,0 ml de metanol e 2,0 ml de tampão fosfato 0,1M pH 6,0. Em seguida, o cartucho foi lavado duas vezes com 3,0 ml água milli-Q e 3,0 ml HCl 0,1M. Após sete minutos de secagem à vácuo (20 mbar) foram adicionados 9,0 ml de metanol. A eluição foi realizada com solução de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (12:3:0,3) recém preparado. Após secagem com N₂ o analito foi ressuspendido com 50 µL de metanol para injeção de 2,0 µL no CG.

Parâmetros Cromatográficos: Temperatura de injeção: 250°C; Modo de injeção splitless; Coluna: HP-5MS 30 x 0,25 x 0,1 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA); Fluxo de Hélio: 1,2 ml/min; Forno: 100°C, rampa 10°C/min, temperatura final: 250°C; Temperatura do detector: 300°C.

3.6. Desenho experimental do primeiro protocolo – Efeito do tratamento repetido de etanol e cocaína após o *CPP*

O desenho experimental do primeiro protocolo deste trabalho está representado na Figura 7. Para as análises de *Western Blotting* (n=6), a eutanásia (E) dos animais foi realizada imediatamente após o teste (T) da preferência condicionada por lugar (*CPP*), em P45, portanto a eutanásia foi realizada durante abstinência aguda de etanol e cocaína.

Figura 7: Desenho experimental – primeiro protocolo. A exposição à PTA de camundongos machos linhagem *Swiss-Webster* foi realizada acompanhada das mães entre o período pós-natal (P)3 a P15, sendo que entre P16 e P34 os animais foram submetidos a um período de abstinência. Em P34 foi realizada a habituação (H) em campo aberto com salina. Em P35 os animais foram submetidos ao teste de sensibilização comportamental cruzada (ES) com salina, cocaína (COC) ou etanol (ETA). Entre P36 e P45 os mesmos animais foram submetidos à *CPP* com cocaína ou etanol. Os animais foram submetidos a uma sessão de habituação de salina em P36, condicionamento de P37 a P44 e teste (T) em P45. A eutanásia (E) foi realizada imediatamente após o teste de preferência condicionada por lugar.

Os animais utilizados para o primeiro protocolo do estudo foram distribuídos em seis grupos experimentais, cada um com seis camundongos machos por grupo, tanto para o teste comportamental de campo aberto quanto para a *CPP*, como descrito a seguir:

- **Grupo CTSAL:** O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e à salina (0,9% w/v de cloreto de sódio), *i.p.*, em um volume de 1 ml/100 g de peso corpóreo durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 *CPP*).

- **Grupo PTASAL:** O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e à salina (0,9% w/v de cloreto de sódio), *i.p.*, em um volume de 1 ml/100 g de peso corpóreo durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 *CPP*).
- **Grupo CTETA:** O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e ao etanol 2,0 g/kg (*i.p.*) durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 *CPP*).
- **Grupo PTAETA:** O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e ao etanol 2,0 g/kg (*i.p.*) durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 *CPP*).
- **Grupo CTCOC:** O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e à cocaína 10,0 mg/kg (*i.p.*) durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 *CPP*).
- **Grupo PTACOC:** O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e à cocaína 10,0 mg/kg (*i.p.*) durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 *CPP*).

3.7. Desenho experimental do segundo protocolo – Efeito do tratamento agudo com cocaína

Em função dos resultados obtidos no primeiro protocolo do projeto, optou-se por realizar o segundo protocolo apenas com a cocaína. Para esse protocolo a eutanásia dos animais foi realizada na vigência da cocaína, ou seja, duas horas após o ensaio de expressão da sensibilização comportamental.

A Figura 8 apresenta o desenho experimental dos testes que foram realizados no segundo protocolo. Vale ressaltar que, para a obtenção dos dados bioquímicos e comportamentais, esse protocolo foi realizado em duas etapas:

- 1- um grupo de animais passou pelo teste de campo aberto e duas horas após o teste de expressão da sensibilização foram eutanasiados,
- 2- um outro grupo de animais passou tanto pelos testes comportamentais de campo aberto quanto pelos de *CPP*.

Figura 8: Desenho experimental – segundo protocolo. A exposição à PTA de camundongos linhagem *Swiss-Webster* foi realizada acompanhada das mães entre o período pós-natal (P)3 a P15, sendo que entre P16 e P34 os animais machos foram submetidos a um período de abstinência. Em P34 foi realizada a habituação (H) em campo aberto com salina. Em P35 os animais machos foram submetidos ao teste de sensibilização comportamental (ES) com salina ou cocaína (COC). Para os ensaios de *Western Blotting* (n=6), em P35 foi realizada a eutanásia (E) dos animais 2 horas após o teste de expressão da sensibilização. Entre P36 e P45 os animais machos foram submetidos à CPP com cocaína. Os animais passaram por uma sessão de habituação de salina em P36, condicionamento de P37 a P44 e teste (T) em P45.

Para os ensaios de *Western Blotting* (n=6), a eutanásia dos animais foi realizada em P36 (dia da expressão da sensibilização comportamental), duas horas após a avaliação da atividade locomotora por meio do campo aberto (IADAROLA et al., 1988; NESTLER, 2002), e as estruturas analisadas foram o estriado e o córtex pré-frontal. Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e o encéfalo foi rapidamente retirado e mergulhado em solução fria de tampão salina-fosfato. As estruturas encefálicas córtex pré-frontal e estriado foram dissecadas sobre uma placa de petri gelada coberta por papel de filtro embebido em solução salina gelada e congeladas em gelo seco. As estruturas foram armazenadas em freezer a -80°C até a realização dos *Western Blotting* (n=6). As análises do campo aberto (n=12) e da CPP (n=10) foram realizadas em seis grupos experimentais, como descrito a seguir:

- **Grupo CTSALSAL:** O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e recebeu salina (0,9% w/v de cloreto de sódio) *i.p.* em um volume de 1 ml/100 g de peso corpóreo durante a avaliação em campo aberto (P35) e na CPP (P36-P45).
- **Grupo PTASALSAL:** O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e recebeu salina (0,9% w/v de cloreto de sódio) *i.p.* em um volume de 1 ml/100

g de peso corpóreo durante a avaliação em campo aberto (P35) e na *CPP* (P36-P45).

- **Grupo CTSALCOC:** O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e recebeu salina (0,9% w/v de cloreto de sódio) *i.p.* em um volume de 1 ml/100 g de peso corpóreo durante a avaliação em campo aberto (P35) e à cocaína 10,0 mg/kg (*i.p.*) durante a *CPP* (P36-P45).
- **Grupo PTASALCOC:** O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e recebeu salina (0,9% w/v de cloreto de sódio) *i.p.* em um volume de 1 ml/100 g de peso corpóreo durante a avaliação em campo aberto (P35), e cocaína 10,0 mg/kg (*i.p.*) durante a *CPP* (P36-P45).
- **Grupo CTCOCCOC:** O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e à cocaína 10,0 mg/kg (*i.p.*) durante a avaliação em campo aberto (P35) e na *CPP*.
- **Grupo PTACOCCOC:** O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e à cocaína 10,0 mg/kg (*i.p.*) durante a avaliação em campo aberto (P35) e na *CPP*.

3.8. Análises comportamentais

3.8.1. Campo aberto – Avaliação da expressão da sensibilização comportamental cruzada

O teste foi realizado em dois dias, sendo o primeiro dia a habituação e o segundo dia o teste agudo (expressão da sensibilização comportamental). O período de “habituação” consiste no conhecimento do aparato, evitando assim possíveis interferências relacionadas à exploração de um ambiente desconhecido. Todos os animais foram habituados durante 15 minutos no campo aberto no dia anterior à análise da atividade locomotora na presença da droga e cada animal, no dia da habituação, recebeu uma solução salina 0,9% por via *i.p.* (CAMARINI et al., 2008; CARRARA-NASCIMENTO et al., 2014).

Para análise da atividade locomotora, no dia da expressão da sensibilização comportamental cruzada, os animais foram avaliados por 15 minutos em campo aberto após administração de solução salina 0,9%, etanol (2,0 g/kg) (CARRARA-

NASCIMENTO et al., 2014) ou cocaína (10,0 mg/Kg) (CAMARINI et al., 2008), pela via *i.p.*, de acordo com o grupo experimental.

A atividade locomotora dos animais foi avaliada pela observação direta em um campo aberto (uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 60 cm de altura, forrada com fórmica preta) com auxílio de uma câmera e do *software Ethovision® XT v5.1 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA)*.

Após a avaliação da atividade locomotora de cada animal, o campo aberto foi limpo com uma solução alcoólica 5%, antes da introdução do próximo animal, para evitar possíveis rastros de odor deixados pelo anterior. Para evitar efeitos circadianos no comportamento dos animais, as observações foram realizadas sempre no período da manhã (08:00 e 12:00hs).

3.8.2. Preferência Condicionada por Lugar

O teste foi realizado em equipamento *Insight®* (EP 156C Lote 161), que consiste em uma caixa retangular de 4,6 x 12,7 x 12,7 cm, com três divisões: um lado com paredes pretas com listras brancas verticais e piso em barras; a parte central com paredes cinzas e piso liso e o outro lado com paredes brancas com listras pretas horizontais e piso em grade reticulada. Cada compartimento é separado por uma porta do tipo guilhotina, conforme Figura 9.

Figura 9: Aparato manual de preferência condicionada por lugar (CPP) da empresa *Insight*® EP 156C vista de cima (foto superior) e vista lateral (foto inferior) do aparato.

O teste durou no total 10 dias, sendo realizado no período da manhã (08:00 e 12:00hs) e dividido em três fases:

- *Habituação* (P36): Os animais receberam injeção de salina e foram colocados, um por vez, no compartimento central (neutro) da caixa, com as portas levantadas, garantindo livre acesso aos outros dois compartimentos. Para o primeiro protocolo (n=6) os animais foram habituados por cinco minutos enquanto para o segundo protocolo (n=10), por 30 minutos. Após esses períodos, os animais foram retirados e devolvidos a sua caixa de origem.

- *Condicionamento* (P37-P44): Os animais receberam injeção de etanol (2,0 g/kg) ou cocaína (10 mg/kg) e salina em dias alternados e foram pareados nos respectivos compartimentos. O compartimento pareado com a droga foi nomeado de CS⁺ e o compartimento pareado com salina de CS⁻. Para o primeiro protocolo (n=6) os animais foram colocados no centro com acesso aos dois compartimentos, um minuto após a injeção. Ao entrarem no compartimento pareado com a substância em questão, a porta foi fechada e os animais foram confinados neste compartimento por cinco minutos. Para o segundo protocolo (n=10), o animal foi colocado no compartimento central e o lado pareado com a substância de interesse

teve sua porta do tipo guilhotina aberta. Após entrar no compartimento de interesse a porta foi fechada e o animal permaneceu neste por 15 minutos e depois foi devolvido à sua caixa. Cabe lembrar que dentro de cada grupo experimental, metade dos animais recebeu a droga no compartimento com paredes pretas com listras brancas verticais e piso em barras e a outra metade no compartimento com paredes brancas com listras pretas horizontais e piso em grade reticulada e vice-versa para salina e cocaína.

- *Teste* (P45): Os animais foram colocados, um por vez, no compartimento central (neutro) da caixa, com livre acesso aos outros dois compartimentos, como na fase de habituação. Tanto para o primeiro (n=6) quanto para o segundo protocolo (n=10) os animais permaneceram por 30 minutos e depois foram devolvidos às suas caixas.

Todas as fases do teste foram filmadas para posterior avaliação do tempo gasto em cada compartimento. O intervalo de tempo gasto no compartimento central foi desconsiderado e, como não houve preferência inicial por um dos compartimentos no dia da habituação, foram utilizadas três formas de avaliação, quando possível:

- a. Análise do compartimento pareado com a droga no dia do teste da *CPP* (CS^{+}_{TESTE});
- b. Análise por delta do dia do teste ($CS^{+}_{TESTE} - CS^{-}_{TESTE}$);
- c. Análise por delta do compartimento pareado com a droga no dia do teste e o compartimento equivalente na habituação ($CS^{+}_{TESTE} - CS^{+}_{HABITUAÇÃO}$) dos 5 minutos iniciais e dos 30 minutos totais.

3.9. Western Blotting

As amostras foram homogeneizadas com tampão Tris-HCl 50 mM [Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo 1,0 mM de PMSF e coquetel inibidor de protease 1:1000 (Sigma)] na diluição 1:2. Todas as amostras foram ajustadas para a mesma concentração proteica (5,0 µg/µL) pelo método de *BRADFORD* (1976), por meio de diluição com Tris-HCl 50 mM. Em seguida, 130 µL da amostra foram diluídos com 30 µL de tampão de Laemmli (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%, 2-mercaptoetanol 5%) e a quantidade de

proteína utilizada para quantificar D1R, D2R, c-Fos, Rac1, FRA1 e dinorfina-A foi de 25 µg. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de 15% contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (SDS – PAGE) conforme originalmente descrito (LAEMMLI, 1970).

Para a separação eletroforética das proteínas foi utilizado tampão composto por Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% pH 8,3 e intensidade de voltagem constante de 100 V. Em seguida, as bandas proteicas foram transferidas eletroforéticamente por meio de sistema submerso para membrana de fluoreto de polivinidileno (PVDF) (Millipore, 0,45 µm) durante 90 minutos (180 mA, 40 V), previamente ativada com metanol. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética de proteínas para a membrana de PVDF foi: Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% e etanol absoluto 18% (v/v). Para comprovar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de *Ponceau* (0,1% em mistura de ácido acético 30% e ácido sulfossalicílico 30%). Após lavagem rápida das membranas para retirada do excesso de corante com tampão TBS-t (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM pH 7,4, contendo Tween-20 0,1%), os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução de caseína 5,0% em tampão TBS-t, sob agitação constante durante 90 minutos. Após a lavagem com tampão TBS-t, as membranas foram incubadas durante 15 a 18 horas, de 2 a 8 °C com anticorpos primários específicos diluídos em TBS-t, conforme observa-se na Tabela 3.

Tabela 3: Relação dos anticorpos primários utilizados nesse projeto, bem como a empresa, lote e diluição padronizada para o teste de *Western Blotting*.

Anticorpo	Empresa	Lote	Diluição padronizada
D1R	<i>Abcam</i> [®]	ab20066	1:500
D2R	<i>Abcam</i> [®]	ab21218	1:500
c-Fos	Santa Cruz Biotechnology	sc-253	1:500
FRA-1	LSBio	LS- B3478	1:750
Dinorfina-A	<i>Abcam</i> [®]	ab82509	1:500
Rac1	<i>Abcam</i> [®]	ab33186	1:1000

Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10 minutos cada) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas – anticorpo policlonal anti-*rabbit* (1:3000) ou anti-*mouse*+AP (1:10000) durante 2 horas.

As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t, e as bandas imunorreativas foram reveladas por incubação com substratos específicos para as enzimas conjugados aos anticorpos secundários, cujas reações envolvem emissão de quimioluminescência. As imagens foram detectadas (ImageQuant AI600 RGB, *GE Healthcare*) e digitalizadas (*ImageQuant TL* v8.1.0.0, *GE Healthcare Life Sciences*) e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas pelo programa *ImageQuant TL 1D* v8.1 e expressas em unidades arbitrárias.

3.10. Análise estatística

Nos testes comportamentais (campo aberto e *CPP*) os grupos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias ou por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Tukey's. Para os resultados do *Western Blotting* foi utilizada ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* Tukey's e considerada diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Purificação da Cocaína

As áreas relativas das concentrações dos padrões de cocaína da *Cerilliant*[®] de 100, 250 e 500 µg/ml, assim como a média das duplicatas e as concentrações reais dos padrões utilizados foram obtidos conforme consta na Tabela 4.

Tabela 4: Concentrações reais obtidas a partir dos padrões de cocaína *Cerilliant*[®] e difenilamina (padrão interno).

Curva Padrão (µg/ml)	Área absoluta Cocaína	Área absoluta Padrão interno	Área relativa	Média das duplicatas	Concentração real (µg/ml)
100A	154,6	29,4	5,2585	5,23348	106,28
100B	159,9	30,7	5,2084		
250A	651,6	32,3	20,173	18,9019	239,89
250B	567,7	32,2	17,630		
500A	1529,2	33,1	46,199	45,8765	503,57
500B	1398,5	30,7	45,553		

A Figura 10 mostra a curva padrão obtida para a cocaína.

Figura 10: Curva padrão (área relativa *versus* concentração) de cocaína. A área relativa foi calculada pela razão entre as duplicatas tanto do padrão de cocaína quanto do padrão interno (difenilamina 50 µg/ml).

Na Figura 11 pode-se observar os cromatogramas obtidos por CG/NPD representativos das análises da cocaína padrão (*Cerilliant*[®]) e da amostra purificada, utilizando difenilamina como padrão interno de análise.

Podemos observar que os picos cromatográficos, tanto da amostra padrão (Figura 11A) quanto da amostra de interesse (Figura 11B), apresentaram-se em tempos de retenção semelhantes de 12,7 minutos. Portanto, a amostra purificada confirmou-se cocaína.

Figura 11: Cromatogramas representativos da solução padrão de cocaína 250 µg/ml (A) e da amostra purificada (B). Tempo de retenção de 12,7 minutos para cocaína e 7,5 minutos para o padrão interno (difenilamina).

A partir da construção da curva de calibração com a cocaína padrão (*Cerilliant*[®]) e comparando a área relativa do pico cromatográfico da amostra de interesse, observamos que nossa amostra purificada apresentou-se com 95% de pureza, que passou a ser utilizada nos testes comportamentais de campo aberto e de CPP.

4.2. Monitorização da exposição

4.2.1. Monóxido de Carbono (CO)

Na Tabela 5 constam os valores em ppm de CO durante três dias de medições na parte da manhã.

Tabela 5: Valores em ppm de CO durante três dias de exposição à PTA.

CO (ppm)			
Tempo monitorado	P3	P5	P7
10 minutos	685	742	567
20 minutos	790	838	667
30 minutos	769	689	753
40 minutos	890	802	815
50 minutos	776	764	699
60 minutos	712	698	520
Média por dia	770	755	670
Média	731,67 ± 53,93		

CO, monóxido de carbono. PTA, poluição tabagística ambiental. P3, P5 e P7 representam, respectivamente, o terceiro, quinto e o sétimo dia de vida pós-natal dos animais que foram expostos à PTA.

4.2.2. Carboxihemoglobina

Os resultados da quantificação da COHb podem ser observados na Tabela 6. O valor é expresso em % de COHb ± EPM.

Tabela 6: Quantificação de COHb em sangue total nos grupos controles (n=3) e nos grupos expostos à PTA (n=6).

Grupos	% COHb
Controle	1,84 ± 0,90
PTA	14,92 ± 6,89

COHb, carboxihemoglobina. PTA, poluição tabagística ambiental

4.2.3. Nicotina e cotinina

A Figura 12 mostra a curva padrão obtida para nicotina e cotinina na faixa de concentração de 5 a 320 ng/ml. A área relativa foi obtida dividindo-se a área do analito pela do padrão interno.

Figura 12: Curva padrão na faixa de concentração de 5 a 320 ng/ml para nicotina (A) e cotinina (B). O prolintano foi utilizado como padrão interno.

Os valores de cotinina e nicotina (média $\pm$ EPM), bem como idade utilizada e o número experimental por grupo dos animais expostos à PTA podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores em ng/ml dos biomarcadores nicotina e cotinina em plasma de animais expostos à PTA.

	Grupos	Nicotina (ng/ml)	Cotinina (ng/ml)
Filhotes Fêmeas 15 dias	CT	Não detectado (ND)	Não detectado (ND)
	PTA	13,33 ± 4,58 (n=10)	15,97 ± 0,97 (n=10)
Machos Adultos 45 dias	CT	Não detectado (ND)	Não detectado (ND)
	PTA	17,78 ± 3,29 (n=4)	23,73 ± 2,51 (n=4)
Mães 65 dias	CT	Não detectado (ND)	Não detectado (ND)
	PTA	12,16 ± 1,48 (n=3)	29,16 ± 2,84 (n=3)

4.3. Primeiro protocolo – Efeito do tratamento repetido de etanol e cocaína após o *CPP*

Inicialmente, realizamos o teste comportamental de campo aberto (n=6) para avaliar o efeito da exposição à fumaça do cigarro em características relacionadas à sensibilização comportamental cruzada e aos efeitos reforçadores pelo etanol e pela cocaína na adolescência. Como no dia do teste da *CPP* há ausência de administração da droga, este pode ser considerado um dia de abstinência aguda.

4.3.1. Habituação e expressão da sensibilização comportamental em campo aberto (n=6) para o etanol

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou que, no teste de campo aberto houve interação entre dia [$F(1,20) = 19,35$; $p < 0,001$], porém não houve efeito estatístico para tratamento (Figura 13).

Figura 13: Avaliação da atividade locomotora total (cm) de animais *Swiss-Webster* com 34 dias de vida (fase de habituação) e 35 dias de vida (fase da expressão da sensibilização) em campo aberto (n=6) submetidos ao tratamento com etanol 2,0 g/kg na fase de expressão da sensibilização. Tanto na fase de habituação quanto na de expressão, a atividade locomotora dos animais foi avaliada durante 15 minutos. CTSAL: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; PTASAL: Animais expostos a PTA e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; CTETA: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; PTAETA: Animais expostos a PTA e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg. Salina e etanol foram administrados por via *i.p.*. Dados expressos como média $\pm$ EPM (n=6). ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Tukey's. ***p<0,001.

4.3.2. Habituação e expressão da sensibilização comportamental em campo aberto (n=6) para a cocaína

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou efeito entre grupos [$F(3,20) = 3,583$; $p < 0,05$] (Figura 14), no dia da expressão. O *post-hoc* Tukey's mostra um aumento na atividade locomotora no grupo tratado com PTA e cocaína (PTACOC) em relação ao grupo tratado apenas com salina (CTSAL), como também entre o grupo tratado com PTA e cocaína (PTACOC) em relação ao seu controle (CTCOC) [$F(3,20) = 3,583$; $p < 0,01$].

Figura 14: Avaliação da atividade locomotora total (cm) de animais *Swiss-Webster* com 34 dias de vida (fase de habituação) e 35 dias de vida (fase da expressão da sensibilização) em campo aberto (n=6) submetidos ao tratamento com cocaína 10,0 mg/kg na fase de expressão da sensibilização. Tanto na fase de habituação quanto na de expressão os animais tiveram sua atividade locomotora avaliada durante 15 minutos. CTSAL: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; PTASAL: Animais expostos a PTA e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; CTCOC: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg; PTACOC: Animais expostos a PTA e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg. Salina e cocaína foram administradas por via *i.p.*. Dados expressos em cm como média $\pm$ EPM (n=6). ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Tukey's. *p<0,05; **p<0,01.

4.3.3. Preferência condicionada por lugar (CPP) para etanol e cocaína

4.3.3.1. Análise do dia do teste (CS⁺)

A Figura 15 apresenta a CPP no dia do teste (P45), a qual foi registrada durante 1800 segundos tanto para o tratamento com etanol quanto para o tratamento com cocaína. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para o CS⁺ em relação ao tempo total do teste.

Figura 15: Teste de preferência condicionada por lugar (*CPP*) ($n=6$) com duração total de 1800s. Os gráficos representam o tempo em segundos gasto no compartimento pareado com a droga (CS^+) no dia do teste da *CPP*. Os grupos em (A) representam a análise em relação ao tratamento com etanol 2,0 g/kg; e os grupos em (B) a análise para o tratamento com cocaína 10,0 mg/kg. CTSAL: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; PTASAL: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; CTETA: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; PTAETA: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; CTCOC: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg; PTACOC: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg. Salina, etanol e cocaína foram administradas por via *i.p.* CS^+ : Compartimento pareado com a droga. Dados expressos em segundos, média $\pm$ EPM ($n=6$). ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* Tukey's.

4.3.3.2. Análise por delta do dia do teste ($CS^+_{\text{TESTE}} - CS^-_{\text{TESTE}}$)

Para um melhor entendimento do protocolo e dos efeitos do tratamento em cada grupo, o teste de *CPP* permite que diferentes formas de análises possam ser empregadas. A Figura 16 apresenta a análise por delta no dia do teste entre o compartimento pareado com a droga (CS^+_{TESTE}) e o compartimento pareado com salina (CS^-_{TESTE}). Tanto para o tratamento com etanol (A) quanto para o tratamento com cocaína (B) não foi observada diferença estatística.

Figura 16: Teste de preferência condicionada por lugar (*CPP*) ($n=6$) com duração total de 1800s para o dia do teste. Os gráficos representam o valor da diferença entre o tempo gasto em segundos no compartimento pareado com a droga (CS^+_{TESTE}) e o tempo gasto no compartimento pareado com salina (CS^-_{TESTE}) no dia do teste da *CPP*. Os grupos em (A) representam a análise em relação ao tratamento com etanol 2,0 g/kg; e os grupos em (B) a análise para o tratamento com cocaína 10,0 mg/kg. CTSAL: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; PTASAL: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9% i.p.; CTETA: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; PTAETA: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; CTCOC: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg; PTACOC: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg. Salina e cocaína foram administradas por via *i.p.*. CS^+ : Compartimento pareado com a droga. Dados expressos em segundos, média $\pm$ EPM ($n=6$). ANOVA de uma via, seguido do teste *post-hoc* Tukey's.

4.3.3.3. Análise por delta ($CS^+_{\text{TESTE}} - CS^+_{\text{HABITUAÇÃO}}$) dos 5 minutos iniciais

Outra forma de análise da *CPP* é considerar tempos equivalentes entre a habituação e o dia do teste. Porém, como o protocolo da primeira parte da *CPP* era composto por 5 minutos de habituação e 30 minutos de teste, o dia do teste foi dividido em faixas de intervalo de tempo (5 em 5 minutos). Assim foi possível comparar os 5 primeiros minutos da habituação e do dia do teste para as drogas em questão, etanol e cocaína. A Figura 17 mostra a análise por delta entre o compartimento pareado com a droga no dia do teste (CS^+_{TESTE}) e o mesmo compartimento pareado com salina no dia da habituação ($CS^+_{\text{HABITUAÇÃO}}$). Não foi observada diferença estatística para o tratamento de etanol (A) e para o tratamento com cocaína (B).

Figura 17: Teste de preferência condicionada por lugar (CPP) (n=6) com duração total de 5 minutos (300 segundos). Os gráficos representam o valor de delta em segundos gasto no compartimento pareado com a droga no dia do teste (CS⁺_{TESTE}) e no compartimento pareado com salina no dia da habituação (CS⁺_{HABITUAÇÃO}). Os grupos em (A) representam a análise em relação ao tratamento com etanol 2,0 g/kg; e os grupos em (B) a análise para o tratamento com cocaína 10,0 mg/kg. CTSAL: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; PTASAL: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; CTETA: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; PTAETA: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; CTCOC: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg; PTACOC: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg. Salina, etanol e cocaína foram administradas por via *i.p.*. CS⁺: Compartimento pareado com a droga. Dados expressos em segundos, média ± EPM (n=6). ANOVA de uma via, seguido do teste *post-hoc* Tukey's.

4.4. Segundo protocolo – Efeito do tratamento agudo com cocaína

Os testes comportamentais do primeiro protocolo deste estudo não evidenciaram alterações para o tratamento com etanol. Assim, optamos por seguir apenas com a cocaína como a droga de abuso de estudo, já que os resultados do primeiro protocolo mostram uma sensibilização cruzada entre PTA e cocaína.

4.4.1. Habituação e expressão da sensibilização comportamental em campo aberto (n=12)

A ANOVA para medidas repetidas indicou interação entre dia e tratamento [$F(3,44) = 30,18$; $p < 0,0001$] e efeito para tratamento [$F(3,44) = 10,21$; $p < 0,0001$]. Na Figura 18, o *post-hoc* de Tukey's mostra aumento da atividade locomotora total entre o grupo exposto à PTA e desafiado com salina (PTASALSAL) em relação ao seu controle (CTSALSAL) ($p < 0,05$), do grupo desafiado com cocaína (CTCOCCOC) em relação ao seu controle (CTSALSAL) ($p < 0,0001$) e entre o grupo exposto à PTA e desafiado com cocaína (PTACOCCOC) em relação ao seu controle (PTASALSAL) ($p < 0,0001$).

Campo aberto - Cocaína

Figura 18: Atividade locomotora total (cm) de animais machos *Swiss-Webster* com 34 dias de vida (P34) submetidos ao tratamento com salina 0,9% durante a fase de habituação e com 35 dias de vida (P35) submetidos ao tratamento com salina 0,9% e cocaína 10,0 mg/kg durante o teste de expressão da sensibilização comportamental. Tanto na fase de habituação quanto na de expressão os animais tiveram sua atividade locomotora avaliada durante 15 minutos. CTSALSAL: animais expostos ao ar sintético

no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com salina 0,9%; PTASALSAL: animais expostos à PTA no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com salina 0,9%; CTCOCCOC: animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com cocaína 10,0 mg/kg; PTACOCCOC: animais expostos à PTA no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com cocaína 10,0 mg/kg. Tanto salina quanto cocaína foram administradas por via *i.p.* Dados expressos como média $\pm$ EPM (n=12). ANOVA de duas vias com medidas repetidas, *post-hoc* Tukey's. *p<0,05; ****p<0,0001.

4.4.2. Preferência Condicionada por Lugar (CPP) (n=10)

4.4.2.1. Análise do dia do teste (CS⁺_{TESTE})

Na CPP (n=10) foi analisado inicialmente o tempo bruto gasto no compartimento pareado com a cocaína no dia do teste (CS⁺_{TESTE}) em relação ao tempo nesse mesmo compartimento na habituação (CS⁺_{HABITUAÇÃO}), como ilustrado na Figura 19.

Foi realizada uma ANOVA de duas vias e nota-se uma diferença estatística entre os dias (habituação e teste) [F(1,36) = 8,489; p<0,01]. O *post-hoc* Tukey's indicou aumento da preferencia do compartimento pareado com a cocaína (CTCOCCOC) em relação ao seu controle (CTSALSAL) (p<0,05).

Figura 19: Teste comportamental de preferência condicionada por lugar (*CPP*) ($n=10$) com duração de 1800 segundos. O gráfico foi obtido com o valor bruto do tempo (segundos) gasto no compartimento pareado com a cocaína no dia do teste (CS^{+}_{TESTE}) em relação ao tempo nesse mesmo compartimento na habituação ($CS^{+}_{HABITUAÇÃO}$). Tanto a habituação quanto o dia do teste tiveram duração total de 1800 segundos. CTSALSAL: O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e à salina 0,9% durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 na preferência condicionada por lugar (*CPP*)); PTASALSAL: O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e à salina 0,9% durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 na *CPP*); CTSALCOC: O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15), à salina 0,9% durante o teste comportamental de campo aberto (P35 – sensibilização comportamental cruzada) e à cocaína 10,0 mg/kg durante o teste comportamental de *CPP* (P36-P45); PTASALCOC: O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15), à salina 0,9% durante o teste comportamental de campo aberto (P35 – sensibilização comportamental cruzada) e à cocaína 10,0 mg/kg durante o teste comportamental de *CPP* (P36-P45). Tanto salina quanto cocaína foram administradas por via *i.p.* Dados expressos como média $\pm$ EPM ($n=10$). ANOVA de duas vias, *post-hoc* Tukey's. ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

4.4.2.2. Análise por delta do dia do teste ($CS^{+}_{TESTE} - CS^{-}_{TESTE}$)

A análise por delta do dia do teste mostrou, conforme observa-se na Figura 30, que houve aumento estatístico da preferência pelo compartimento pareado com cocaína (CTCOCCOC) em relação ao seu controle (CTSALSAL) [$F(3,36) = 4,0446$; $p < 0,05$].

Figura 20: Análise por delta do dia do teste do teste comportamental de preferência condicionada por lugar (CPP). O gráfico foi obtido pela diferença entre o compartimento pareado com a cocaína no dia do teste (CS^{+}_{TESTE}) em relação ao compartimento pareado com salina no dia do teste (CS^{-}). CTSALSAL: O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e à salina 0,9% durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 na CPP); PTASALSAL: O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e à salina 0,9% durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 na CPP); CTCOCCOC: O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e à cocaína 10,0 mg/kg durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 na CPP) e PTACOCCOC: O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e à cocaína 10,0 mg/kg durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 na CPP). Tanto salina quanto cocaína foram administradas por via *i.p.* Dados expressos como média $\pm$ EPM ($n=10$). ANOVA de uma via, *post-hoc* Tukey's. * $p < 0,05$.

A mesma análise por delta do dia do teste foi realizada apenas com os grupos agudos controles tratados com cocaína (CTSALCOC) e os grupos

expostos à PTA e tratados com cocaína (PTASALCOC). A Figura 21 mostra um aumento da preferência condicionada por lugar no grupo controle tratado com cocaína (CTSALCOC) em relação ao seu controle (CTSALSAL) [$F(3,36) = 7,193$; $p < 0,001$]. Estes resultados evidenciam que não há influência do tratamento realizado no campo aberto na análise dos efeitos do tratamento no teste de *CPP*.

Figura 21: Análise por delta do dia do teste do teste comportamental de preferência condicionada por lugar (*CPP*) dos grupos agudos. O gráfico foi obtido pela diferença entre o compartimento pareado com a cocaína no dia do teste (CS⁺_{TESTE}) em relação ao compartimento pareado com salina no dia do teste (CS⁻_{TESTE}). CTSALSAL: O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15) e à salina 0,9% durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 na *CPP*); PTASALSAL: O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15) e à salina 0,9% durante os testes comportamentais (P35 – sensibilização comportamental cruzada e P36-P45 na *CPP*); CTSALCOC: O grupo foi exposto ao ar sintético por 13 dias (P3 a P15), à salina 0,9% durante o teste comportamental de campo aberto (P35 – sensibilização comportamental cruzada) e à cocaína 10,0 mg/kg durante o teste comportamental de *CPP* (P36-P45); PTASALCOC: O grupo foi exposto à PTA por 13 dias (P3 a P15), à salina 0,9% durante o teste comportamental de campo aberto (P35 – sensibilização comportamental cruzada) e à cocaína 10,0 mg/kg durante o teste comportamental de *CPP* (P36-P45). Tanto salina quanto cocaína foram administradas por via *i.p.* Dados expressos como média ± EPM (n=10). ANOVA de uma via, *post-hoc* Tukey's. *** $p < 0,001$.

4.5. Avaliação dos marcadores bioquímicos de sensibilização comportamental no estriado e no córtex pré-frontal por *Western Blotting* (n=6) para o efeito do tratamento repetido de etanol e cocaína após o *CPP* – Primeiro protocolo

Para o primeiro protocolo, a eutanásia dos animais foi realizada imediatamente após o dia do teste da *CPP*, em P45 e a dinorfina-A não foi avaliada.

4.5.1. DR1, DR2, c-Fos, FRA1 e Rac1 no estriado – Tratamento com etanol

A Figura 22 mostra o resultado da quantificação das proteínas D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 por *Western Blotting* no estriado dos animais tratados com etanol 2,0 g/kg. Este tratamento induziu diminuição na concentração de DR1 nos grupos tratados com etanol (CTETA) e expostos à PTA e tratados com etanol (PTAETA) em relação ao controle (CTSAL) [$p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; $F(3,20) = 5,474$]. Nenhuma outra diferença significativa foi observada.

Estriado – Tratamento com etanol

Figura 22: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 no estriado por *Western Blotting* (n=6) no estriado de animais machos *Swiss-Webster* tratados com etanol 2,0 g/kg nos testes comportamentais. Os animais foram eutanasiados em P45, imediatamente após o teste comportamental de *CPP*. CTSAL: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; PTASAL: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; CTETA: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; PTAETA: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg. Os tratamentos foram administrados por via *i.p.* Dados expressos em % em relação ao CTSAL (média $\pm$ EPM). ANOVA de uma via, *post-hoc* Tukey's. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

4.5.2. DR1, DR2, c-Fos, FRA1 e Rac1 no estriado – Tratamento com cocaína

A Figura 23 apresenta o resultado da quantificação das proteínas D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 por *Western Blotting* no estriado dos animais tratados com cocaína 10,0 mg/kg. Nenhuma diferença estatística foi observada.

Estriado – Tratamento com cocaína

Figura 23: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 no estriado por *Western Blotting* (n=6) no estriado de animais machos *Swiss-Webster* tratados com cocaína 10,0 mg/kg nos testes comportamentais. Os animais foram eutanasiados em P45, imediatamente após o teste de *CPP*. CTSAL: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; PTASAL: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; CTCOC: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg; PTACOC: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg. Os tratamentos foram administrados por via *i.p.* Dados expressos em % em relação ao CTSAL (média ± EPM). ANOVA de uma via, *post-hoc* Tukey's.

4.5.3. DR1, DR2, c-Fos, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal – Tratamento com etanol

A Figura 24 mostra o resultado da quantificação das proteínas D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 por *Western Blotting* no córtex pré-frontal dos animais tratados com etanol 2,0 g/kg. Nenhuma diferença estatística foi observada.

Córtex pré-frontal – Tratamento com etanol

Figura 24: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal por *Western Blotting* (n=6) no córtex pré-frontal de animais machos Swiss-Webster tratados com etanol 2,0g/kg nos testes comportamentais. Os animais foram eutanasiados em P45, imediatamente após o teste de *CPP*. CTSAL: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; PTASAL: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; CTETA: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; PTAETA: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com etanol 2,0 g/kg; Os tratamentos foram administrados por via *i.p.* Dados expressos em % em relação ao CTSAL (média ± EPM). ANOVA de uma via, *post-hoc* Tukey's.

4.5.4. DR1, DR2, c-Fos, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal – Tratamento com cocaína

A Figura 25 apresenta o resultado da quantificação das proteínas D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 por *Western Blotting* no córtex pré-frontal dos animais tratados com cocaína 10,0 mg/kg. Nenhuma diferença estatística foi observada.

Córtex pré-frontal – Tratamento com cocaína

Figura 25: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal por *Western Blotting* (n=6) no estriado de animais machos Swiss-Webster tratados com cocaína 10,0 mg/kg nos testes comportamentais. Os animais foram eutanasiados em P45, imediatamente após o teste de *CPP*. CTSAL: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; PTASAL: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com salina 0,9%; CTCOC: Animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg; PTACOC: Animais expostos à PTA e nos testes comportamentais desafiados com cocaína 10,0 mg/kg. Os tratamentos foram administrados por via *i.p.* Dados expressos em % em relação ao CTSAL (média $\pm$ EPM). ANOVA de uma via, *post-hoc* Tukey's.

4.6. Avaliação dos marcadores bioquímicos por *Western Blotting* (n=6) no tratamento agudo com cocaína – Segundo protocolo

No segundo protocolo, a eutanásia dos animais foi realizada duas horas após o teste de expressão da sensibilização comportamental, em P35.

4.6.1. DR1, DR2, c-Fos, dinorfina-A, FRA1 e Rac1 no estriado – Tratamento com cocaína

A Figura 26 apresenta o resultado da quantificação das proteínas D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 por *Western Blotting* no estriado dos animais tratados com cocaína 10 mg/kg. O tratamento com cocaína induziu aumento na concentração da proteína c-Fos no grupo tratado (CTCOCCOC) em relação ao seu controle (CTSALSAL) [$F(3,20)=6,406$; $p<0,01$]. Nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi observada.

Figura 26: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, dinorfina-A, FRA1 e Rac1 por *Western Blotting* (n=6) no estriado de animais machos *Swiss-Webster* eutanasiados em P35, duas horas após o teste comportamental de campo aberto – segundo protocolo. CTSALSAL: animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com salina 0,9%; PTASALSAL: animais expostos à PTA no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com salina 0,9%; CTCOCCOC: animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com cocaína 10,0 mg/kg; PTACOCCOC: animais expostos à PTA no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com cocaína 10,0 mg/kg. Tanto salina quanto cocaína foram administradas na forma intraperitoneal (i.p.). Dados expressos em % em relação ao CTSALSAL (média $\pm$ EPM). ANOVA de uma via, *post-hoc* Tukey's. *p<0,05; **p<0,01.

4.6.2. DR1, DR2, c-Fos, dinorfina-A, FRA1 e Rac1 no córtex pré-frontal – Tratamento com cocaína

A Figura 27 apresenta o resultado da quantificação das proteínas D1R, D2R, c-Fos, FRA1 e Rac1 por *Western Blotting* no córtex pré-frontal dos animais tratados com cocaína 10 mg/kg. O tratamento com cocaína 10 mg/kg induziu aumento na concentração da proteína c-Fos no grupo tratado com cocaína (CTCOCCOC) em relação ao seu controle (CTSALSAL) [$F(3,20) = 6,846$ $p < 0,01$]. Em relação a dinorfina-A observa-se um aumento de sua concentração no grupo tratado com cocaína (CTCOCCOC) em relação ao seu controle (CTSALSAL) [$F(3,19) = 9,280$; $p < 0,01$] e diminuição no grupo exposto à PTA e tratado com cocaína (PTACOCCOC) em relação ao grupo controle tratado com cocaína (CTCOCCOC) [$F(3,19) = 9,280$; $p < 0,05$]. Nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi observada.

Córtex pré-frontal

Figura 27: Quantificação de D1R, D2R, c-Fos, dinorfina-A, FRA1 e Rac1 por *Western Blotting* (n=6) no córtex pré-frontal de animais machos *Swiss-Webster* eutanasiados em P35, duas horas após o teste comportamental de campo aberto – segundo protocolo. CTSALSAL: animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com salina 0,9%; PTASALSAL: animais expostos à PTA no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com salina 0,9%; CTCOCCOC: animais expostos ao ar sintético no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com cocaína 10,0 mg/kg; PTACOCCOC: animais expostos à PTA no início do período pós-natal e no teste comportamental de campo aberto desafiados com cocaína 10,0 mg/kg. Tanto salina quanto cocaína foram administradas via *i.p.*. Dados expressos em % em relação ao CTSALSAL (média $\pm$ EPM). ANOVA de uma via, *post-hoc* Tukey's. *p<0,05; **p<0,01.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O uso do tabaco é responsável por 5,1 milhões de mortes por ano, sendo a segunda maior causa de mortes no mundo (PICCIOTO; KENNY, 2013). O consumo diário de tabaco atinge 30% da população mundial, aproximadamente 1,3 bilhões de pessoas são fumantes (OMS, 2010). A OMS prevê que para 2030, cerca de 1,6 bilhões de pessoas sejam fumantes. Já em relação aos fumantes passivos, o número alcança os dois bilhões, sendo que 700 mil são crianças (SAMET; YOON, 2001).

Diversos estudos com foco nos efeitos da fumaça do cigarro utilizam os cigarros referências, produzidos pela Universidade de Kentucky (ABREU-VILLAÇA et al., 2010, 2013; GERBER et al., 2015; ROEMER et al., 2012). Os cigarros de referência desempenham um papel importante na identificação e avaliação dos efeitos relacionados com a fumaça do cigarro. Estes cigarros permitem a replicação e comparação de experimentos realizados entre os grupos de pesquisa, permitindo uma maior confiabilidade nos dados apresentados (ROEMER et al., 2012). Tais cigarros possuem composição similar aos principais cigarros comerciais (ROBERTO et al., 2005).

No presente estudo, realizamos a monitorização biológica para determinação de COHb em sangue total, além da quantificação de nicotina e cotinina em plasma. O sangue dos animais expostos à fumaça do cigarro foi coletado imediatamente após a última exposição, já que a COHb em camundongos possui meia-vida curta (30 minutos) devido à ligação lábil entre o CO e a hemoglobina (ROBERTO et al., 2005). Os valores obtidos para COHb neste trabalho estão de acordo com os encontrados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, no qual o valor de COHb no grupo exposto à PTA foi de 12%. Esses resultados corroboram os realizados por Sen et al. (2010) que realizaram uma exposição única de cigarros de referência 2R1 (0,85 mg de nicotina/cigarro) por meio de uma câmara de exposição automatizada durante uma hora e encontraram concentrações de carboxihemoglobina de 15,3% em camundongos C57BL/6J e concentrações de 13,2% para camundongos *Swiss-Webster*.

Em humanos, a cotinina possui uma meia-vida de aproximadamente 20 horas, e é normalmente detectada por vários dias após o uso do tabaco. A

concentração de cotinina no plasma, saliva e urina é proporcional ao grau de exposição à poluição tabagística ambiental, portanto, ela é um biomarcador de exposição tabagística. Os nossos valores plasmáticos de cotinina estão de acordo com os encontrados por JARVIS et al. (2008) uma vez que os mesmos encontram-se na faixa de 10 a 100 ng/ml, e estes valores estão associados à fumantes passivos leves ou moderados. Já concentrações plasmáticas acima de 300 ng/ml equivalem a fumantes passivos pesados, os quais estão expostos à fumaça de mais de 20 cigarros por dia exalada pelo fumante ativo ou pela queima da ponta do cigarro acesa. Na urina, valores entre 11 ng/ml e 30 ng/ml podem estar associados à fumantes leves (de um a dois cigarros dia) ou exposição passiva, enquanto concentrações de 500 ng/ml ou mais caracterizam um fumante ativo pesado (mais de 20 cigarros ao dia) (JARVIS et al., 2008).

Em trabalho anterior de nosso grupo, apesar da concentração de COHb ser similar à do presente trabalho, os valores de nicotina e cotinina encontrados foram maiores, sendo de 126,1 e 100,8 ng/ml, respectivamente (TORRES et al., 2015). O protocolo de exposição é similar, contudo Torres et al. (2015) utilizaram camundongos BALB/c, enquanto no presente estudo utilizamos camundongos *Swiss-Webster*.

Para um melhor entendimento da diferença encontrada nos valores plasmáticos de nicotina e cotinina, entre as espécies utilizadas pelo nosso grupo de pesquisa, foi realizada uma exposição de camundongos C57BL/5 de 65 dias de vida, e foi realizada a quantificação de nicotina e cotinina obtendo-se valores de 160,18 ng/ml e 95,67 ng/ml, respectivamente. Vale ressaltar que no mesmo momento, em outra caixa de polipropileno, quatro animais *Swiss-Webster* machos com 45 dias de vida foram expostos à fumaça do cigarro nas mesmas condições, e os valores de nicotina e cotinina encontrados foram de 17,78 ng/ml e 23,73 ng/ml, respectivamente. Podemos concluir que os valores encontrados para os animais C57BL/5 são semelhantes aos resultados anteriores de Torres et al. (2015), evidenciando assim, que os parâmetros utilizados na exposição são constantes e, portanto, a variação nos valores encontrados estão associados à espécie, seja por alteração na biotransformação da mesma ou por parâmetros de excreção.

Abreu-Villaça et al. (2013) avaliaram as concentrações de cotinina por meio de um *kit* de quantificação (Orasure Technologies, Pennsylvania, USA) na

exposição à fumaça do cigarro de referência *2R1F* em Swiss-Webster com 45 dias de vida (P45). A exposição aos animais à fumaça foi realizada por meio de uma câmara automática (*Teague Enterprises, Davis, CA, USA*), por 15 dias durante a adolescência (P30-P45), com oito horas de exposição diária (quatro horas no período da manhã e quatro horas no período da tarde). Os valores de cotinina não foram diferentes para machos e fêmeas, portanto, o que vai de encontro com nossos resultados entre as diferentes idades e sexo. Os valores encontrados de cotinina nas fêmeas foram de $69,4 \pm 6,8$ ng/ml, e nos machos de $64,5 \pm 1,8$ ng/ml. Para o controle (exposto apenas ao ar sintético) foi encontrado um valor abaixo do limite de quantificação da técnica (< 8 ng/ml). Os valores de cotinina encontrados por Abreu-Villaça e sua equipe encontram-se três vezes maiores que o encontrado neste presente projeto, porém, essa diferença pode ser justificada tanto pelo tempo de exposição ter sido de uma hora enquanto Abreu-Villaça foi em um período de 4 horas quanto a diferença entre a composição dos cigarros utilizados, uma vez que utilizamos o cigarro de referência *3R4F* (0,726 mg de nicotina/cigarro) enquanto Abreu-Villaça utilizou cigarros *2R1R* (1,74 mg de nicotina/cigarro).

Dickson et al. (2014) avaliaram os efeitos da exposição à nicotina (24 mg/kg/dia) por meio de minibombas osmóticas as quais foram implantadas em camundongos machos C57BL/6J com 42 dias de vida. A concentração de cotinina foi avaliada em plasma, sendo encontrado um valor médio de 62,02 ng/ml e a quantificação deste produto de biotransformação resultou em concentrações de cotinina no plasma dos camundongos semelhantes às observadas em humanos (adolescentes fumantes). Cabe lembrar que esse modelo de exposição à nicotina por meio de minibombas permite uma liberação controlada e constante da nicotina, não refletindo a real exposição ambiental quando comparada à fumaça de cigarro.

A nicotina tem sido descrita como o componente ativo da fumaça do cigarro responsável por uma ampla variedade de efeitos no sistema nervoso resultante do consumo de tabaco (SLOTKIN, 2002). Apesar de evidências das propriedades neuroativas dos componentes não nicotínicos da fumaça do cigarro (ABREU-VILLAÇA et al., 2010; BRUIJNZEEL, 2012; ROSE, 2006; VILLÉGIÉ et al., 2010), muitos estudos experimentais analisam o efeito da nicotina isoladamente (ABREU-VILLAÇA et al., 2013). Apesar do número

elevado de pessoas que fazem uso de substâncias de abuso, apenas uma pequena, porém considerável porcentagem torna-se dependente (UHL; GROW, 2004). Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística da Sociedade Americana de Psiquiatria (DSM-V) a dependência de substâncias de abuso é conceituada como um padrão mal-adaptado de uso de uma substância psicoativa, que causam consequências adversas ao indivíduo. Em geral, este é um processo que se inicia com o uso ocasional da substância de abuso e evolui para o uso compulsivo.

As drogas de abuso podem agir como reforçadores positivos (produzindo euforia e bem estar) ou negativo (alívio dos sintomas de abstinência), e assim reforçam, ou seja, aumentam a chance do indivíduo utilizar a droga novamente. Esses efeitos reforçadores positivos promovidos pelas drogas de abuso são de extrema importância no início do uso, mas com o uso repetido da droga, esses efeitos tendem a diminuir (CARVALHO; TAKAHASHI, 2014).

O desenvolvimento da sensibilização comportamental à psicoestimulantes como a cocaína, anfetaminas e nicotina após exposição repetida em camundongos e ratos é de extrema importância no entendimento da fisiopatologia da dependência e desejo em humanos. Enquanto muitos estudos evidenciam a sensibilização induzida por cocaína ou anfetamina, pouco se sabe sobre as consequências comportamentais após administração repetida a outras substâncias, como etanol e nicotina, e de forma mais específica, se há possibilidade do desenvolvimento da sensibilização cruzada entre essas substâncias (ITZHAK; MARTIN, 1999).

Neste trabalho, nosso foco foi avaliar os efeitos da PTA, e não apenas da nicotina, no período pós-natal, na predisposição ao uso das drogas de abuso, na adolescência. Os resultados da primeira parte foram mais expressivos em relação ao grupo tratado com cocaína, uma vez que observamos um aumento da atividade locomotora e consequentemente uma sensibilização comportamental cruzada para os grupos tratados com cocaína (CTCOC) e expostos à PTA e tratados com cocaína (PTACOC). Portanto, optamos por seguir o protocolo focando nos efeitos da cocaína. No segundo protocolo foram acrescentados dois grupos agudos nos testes comportamentais: CTSALCOC e PTASALCOC. Tais testes foram realizados para avaliar se as substâncias administradas para a análise em campo aberto não iriam interferir nos resultados

obtidos na *CPP*. Os dados obtidos foram satisfatórios, uma vez que comprovam que a exposição prévia à cocaína não interfere nos testes de *CPP*.

De acordo com Robinson e Berridge (1993), a sensibilização comportamental reflete alterações moleculares no SNC que aumenta a vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência. Segundo esses autores, a sensibilização está relacionada ao aumento da motivação para o uso de drogas. Exposição repetida a drogas estimulantes resultam com frequência em sensibilização para seus efeitos de ativação do sistema locomotor (BABBINI; DAVIS, 1972; SCHNUR; BRAVO; TRUJILLO, 1983). Postulam-se relações biológicas entre a ativação e a recompensa dos efeitos das drogas que podem levar à dependência (WISE; BOZARTH, 1987), delineando os mecanismos envolvidos na sensibilização comportamental que possam ser úteis para a compreensão do comportamento de procura e recaída da droga (HINSON; POULOS, 1981). Um importante determinante da sensibilização aos efeitos das drogas é a relação entre os estímulos ambientais e a recompensa pela droga. A relação positiva entre esses eventos pode levar a uma associação capaz de mediar o desenvolvimento da sensibilização (VEZINA; SPRAGUE-DAWLEY, 1996). A evidência dessa associação tem sido provada na maior parte das vezes por testes específicos que mostram a expressão da sensibilização comportamental dependente do ambiente em que a droga foi originalmente recebida (HINSON; POULOS, 1981). Essa propriedade torna a *CPP* uma ferramenta potencialmente útil para avaliar a procura pela droga, desde a presença das pistas do condicionamento associado a essas substâncias, a qual se presume ser a grande responsável pela fissura e a recaída em dependentes, até os efeitos dessa retirada (TZSCHENTKE, 2007).

Nossos resultados indicam que houve efeito estimulatório nos grupos tratados com cocaína no segundo protocolo deste estudo, representado pelo aumento da atividade locomotora após administração da droga. Por outro lado, não observamos sensibilização cruzada pela PTA. Em conjunto, estes resultados podem refletir a baixa concentração de nicotina observada nos animais utilizados no presente estudo.

Outra forma de avaliar as possíveis alterações no SNC de roedores tanto no período pré-natal quanto antes e após a adolescência é a exposição à nicotina por meio de minibombas de infusão. Mais ainda, esta estratégia tem

sido usada em estudos que visam avaliar se a nicotina pode ser a porta de entrada para outras drogas como também se a mesma pode influenciar na formação ou no refinamento das conexões sinápticas, sendo que esse processo persiste até o final da adolescência.

Kemppainen; Hyytia e Kiianmaa (2009) verificaram que animais expostos ao etanol por um período de 28 dias não apresentaram aumento no consumo de etanol nem nos animais que haviam recebido nicotina na adolescência e nem naqueles expostos à esta substância na idade adulta. Ou seja, mostraram que a pré-exposição à nicotina sob a forma de minibomba, tanto na adolescência como na idade adulta, não foi capaz de alterar o consumo de etanol.

LE, et al. (2003) avaliaram que a exposição prévia de nicotina (3 mg/kg/dia; subcutânea) em ratos *Wistar* por meio de minibombas na adolescência (P28-37) não foi capaz de alterar a busca por etanol na fase adulta (P75-79). Uma possível explicação proposta por Kota, et al. (2007) e Le, et al. (2003) é de que roedores adolescentes são menos susceptíveis aos sintomas da abstinência da nicotina do que os adultos. Por exemplo, Kota et al. (2007) realizaram um tratamento crônico com nicotina (48 mg/kg/dia) durante 10 dias comparando camundongos adultos e adolescentes e avaliaram comportamento tipo ansioso desses animais, bem como a *CPP*. Foi observado que apenas camundongos adultos apresentaram aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade e uma preferência condicionada na concentração de 0,5 mg/kg de nicotina em relação aos adolescentes, que não apresentaram diferenças. Em relação ao uso concomitante da nicotina com outras substâncias, alguns estudos mostram aumento na autoadministração de etanol, quando os animais são expostos à nicotina (LE, et al., 2000, 2003; CLARK, et al., 2001; LÓPEZ-MORENO, et al., 2004), enquanto outros indicam que a exposição à nicotina diminui o consumo de etanol (NADAL, SAMSON, 1999; DYR, et al., 1999; SHARPE; SAMSON, 2002). As diferenças encontradas nos trabalhos acima se devem, principalmente, a diferentes protocolos e diferentes linhagens utilizadas.

Frente a isso, poucos grupos de pesquisa avaliaram a real exposição do ser humano à fumaça do cigarro e não só à nicotina, na predisposição ao uso de drogas de abuso ou como porta de entrada a outras drogas.

Esse termo “porta de entrada” é utilizado para se referir a um fenômeno no qual a utilização de uma droga aumenta a probabilidade de utilização de outra

droga. Uma possibilidade discutida anteriormente é de que o uso de uma droga iniciadora pode levar à sensibilização para a segunda droga. Em estudos comportamentais utilizando animais, esse fenômeno é conhecido como sensibilização cruzada. Contudo, a sensibilização cruzada quando predispõe a dependência, depende de outros fatores que podem contribuir para esse efeito de porta de entrada. Fatores incluindo sexo, *status* social, condição sócio-econômica, cultura, estresse, entre outros têm sido relacionados com a influência na utilização de drogas que levam a dependência. Com relação à quantificação das proteínas, nosso estudo mostrou diminuição na concentração de receptores DR1 no estriado no grupo exposto à PTA e tratado com etanol em relação ao grupo controle tratado com etanol no primeiro protocolo deste estudo. Como a eutanásia foi realizada após o teste de *CPP* estes resultados sugerem que a exposição repetida ao etanol é capaz de induzir alterações nos receptores de dopamina na abstinência aguda ao etanol. De fato, esses resultados confirmam os efeitos nocivos do etanol sobre o neurodesenvolvimento e confirmam os estudos propostos por Margret et al. (2005) e Oladehin et al. (2007) que evidenciaram que a exposição pós-natal de camundongos ao etanol diminui a atividade locomotora e a neurogênese, bem como diminui os receptores D1R e D2R, possivelmente causada pelo aumento na concentração de dopamina.

O estriado é composto pelo CPu e pelo NAc (BERKE; HYMAN, 2000; HYMAN, 1996; KOOB et al., 1998) os quais se diferem em muitos aspectos em sua anatomia e fisiologia, e podem responder de maneiras diferentes à administração de cocaína (KOOB et al., 1998). Costall et al., (1977) demonstraram que a dopamina pode exercer diferentes funções no CPu e no NAc como mediação na estereotipagem e hiperatividade. O CPu e NAc regulam de forma distinta as propriedades reforçadoras da cocaína, relacionado com a sua recompensa e aspectos motivacionais (VEENEMAN et al., 2012).

No segundo protocolo deste estudo os animais foram eutanasiados duas horas após o teste de expressão da sensibilização, avaliando assim os marcadores bioquímicos na vigência da cocaína. Observamos aumento de c-Fos no estriado e no córtex pré-frontal no grupo tratado com cocaína (CTCOCCOC) em relação ao seu controle (CTSALSAL). Estudos prévios têm mostrado que ocorre um rápido e transitório aumento de c-Fos no estriado, córtex pré-frontal e

NAC de animais tratados agudamente com cocaína (GRAYBIEL, 1990; TORRES; RIVIER, 1992; DALIA; WALLACE, 1995; CURRAN et al., 1996). No entanto, foi demonstrado que, em animais sensibilizados pela cocaína em tratamento repetido, a proteína c-Fos diminuiu nestas mesmas estruturas (MORATALLA, 1996a, 1996b; TODTENKOPF et al., 2002). Além disso, observou-se que a administração aguda de nicotina induz a rápida expressão do gene *c-fos* em várias estruturas encefálicas de ratos (SALMINEN et al., 1996; SEPPA et al., 2001). No entanto, durante a administração contínua, foi relatada uma indução atenuada de c-Fos (SALMINEN, 1999). Adicionalmente, injeções repetidas de nicotina induziram sensibilização comportamental em ratos, os quais apresentaram diminuição de c-Fos no NAc (SHIM et al., 2001). Zhang et al. (2006) relataram que camundongos com deficiência ou ausência do gene *c-fos* apresentaram diminuição da sensibilização comportamental e aumento de preferência condicionada por lugar à cocaína, como também uma diminuição da densidade dos espinhos dendríticos.

No segundo protocolo também foi possível observar que a exposição aguda à cocaína é capaz de induzir aumento da dinorfina no córtex pré-frontal (CTCOCCOC em relação ao CTSALSAL), enquanto à exposição prévia à PTA previne este aumento (PTACOCCOC em relação ao CTCOCCOC). Esse aumento de dinorfina-A está de acordo com estudos que evidenciam que a expressão gênica de pró-dinorfina em regiões encefálicas envolvidas com o controle do humor e da motivação é aumentada na presença de psicoestimulantes como a cocaína e outras drogas de abuso. A dinorfina está distribuída por todo o encéfalo e medula espinhal e é um dos seus principais produtos pós-translacionais, pois constitui um ligante endógeno dos receptores opioides do tipo κ . Substâncias capazes de aumentar a transmissão dopaminérgica estriatal induzem a expressão de genes para a pró-dinorfina, enquanto que a depleção de dopamina diminui a expressão de RNA mensageiro da dinorfina (SHIPPENBERG et al., 2007). Um aumento da expressão de pró-dinorfina no estriado e conseqüentemente um aumento da transmissão sináptica de dopamina pelas drogas de abuso é também observado como resposta a outros psicoestimulantes como os opiáceos, nicotina e etanol. Este efeito foi observado no estudo *post-mortem* com humanos em usuários de cocaína e em modelos animais de auto-administração de cocaína (BRANDON, STEINER,

2003; DI BENEDETTO et al., 2006; MATHIEU-KIA, BESSON, 1998). Estímulos excitatórios no córtex pré-frontal regulam a neurotransmissão da dopamina. Portanto, alterações na expressão de pró-dinorfina podem alterar a transmissão glutamatérgica ou afetar diretamente neurônios dopaminérgicos (SHIPPENBERG et al., 2007).

Vale ressaltar que o desenvolvimento do córtex pré-frontal, estrutura encefálica que tem importante função cognitiva, como tomadas de decisões e modulação do comportamento social, se estende até o final da adolescência (HUTTENLOCHER; DABHOLKAR, 1997). Por exemplo, a sinaptogênese no neocórtex em humanos ocorre durante o terceiro trimestre da gestação e durante os primeiros dois anos pós-natal. Em seguida há um período de eliminação de sinapses durante o qual a densidade sináptica é reduzida em cerca de 60% do máximo. Tal processo é fundamental para o refinamento das conexões sinápticas. No córtex auditivo este processo é concluído até os 12 anos de idade, enquanto que no córtex pré-frontal, até meados da adolescência (HUTTENLOCHER; DABHOLKAR, 1997).

Em resumo, avaliar a dependência é levar em conta diversos fatores, desde genéticos até ambientais, como também a susceptibilidade individual nas respostas a diversos xenobióticos potencialmente neurotóxicos.

Vale ressaltar que esse trabalho é inovador uma vez que avaliamos a exposição à PTA na infância e se esta poderia levar a sensibilização cruzada com a cocaína e à alterações em vias envolvidas nesse comportamento na adolescência. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a exposição à fumaça do cigarro, mesmo gerando baixas concentrações plasmáticas de nicotina e cotinina, foi capaz de produzir alterações na expressão da sensibilização comportamental e alterações bioquímicas, tanto no tratamento repetido de etanol e de cocaína quanto na vigência da cocaína. Estudos como esse são de extrema importância uma vez que auxiliam a implementação de possíveis políticas públicas no controle e prevenção dos danos causados pelo fumo passivo.

6. CONCLUSÕES

- O tratamento com cocaína foi eficaz para induzir expressão da sensibilização comportamental e da preferência condicionada por lugar.
- A exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal não contribuiu para sensibilização cruzada com a cocaína durante a adolescência, provavelmente devido à baixa concentração plasmática de nicotina observada nos animais utilizados no presente estudo.
- A exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal previne o aumento da dinorfina induzido pela exposição aguda à cocaína no córtex pré-frontal durante a adolescência.
- Na vigência da cocaína tem-se um aumento da proteína c-Fos tanto para o córtex pré-frontal quanto no estriado.
- A exposição repetida ao etanol durante os testes comportamentais é capaz de induzir alterações nos receptores de dopamina DR1 quando avaliados na abstinência de etanol.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ABREU-VILLAÇA, Y., FILGUEIRAS, C.C., GUTHIERREZ, M., MEDEIROS, A.H., MATTOS, M.A., PEREIRAMDOS, S., MANHÃES, A.C., KUBRUSLY, R.C. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. **Nicotine Tob.Res.** 12, 776–780, 2010.
- ABREU-VILLAÇA, Y. et al. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol during adolescence leads to short- and long-term modulation of anxiety-like behavior. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 133, n. 1, p. 52–60, 2013.
- AGRAWAL, A.; SARTOR, C.; PERGADIA, M.L.; HUIZINK, A.C.; LYNSKEY, M.T. Correlates of smoking cessation in a nationally representative sample of U.S. adults. **Addictive Behaviors**. v.33, p.1223–1226, 2008.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM). Ed.5, **American Psychiatric Association**, Washington, DC, 2013.
- BABBINI, M.; DAVIS, W. M. Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. **British journal of pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 213–24, 1972.
- BADIANI, A.; CABIB, S.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Chronic stress induces strain-dependent sensitization to the behavioral effects of amphetamine in the mouse. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 43, p. 53-60, 1992.
- BELANGER, R.; MARCLAY, F.; BERCHTOLD, A.; AKRE, C.; SAUGY, M.; SURIS, J.C. Is cannabis use a significant exposition to nicotine? **Journal of Adolescent Health**. v.48, S71–S72, 2011.
- BENOWITZ, N.L.; PORCHET, H.; JACOB, P. Pharmacokinetics, metabolism, and pharmacodynamics of nicotine. Nicotine psychopharmacology: molecular, cellular, and behavioural aspects. Oxford: Oxford University **Press**. p.112–157, 1990.
- BENOWITZ, N.L. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v.36, p.597–613, 1996.
- BERKE, J.D.; HYMAN, S.E. Addiction, dopamine and the molecular mechanisms of memory. **Neuron**. v.25, p.515–532, 2000.

- BHATTACHARYA, S.; ZHANG, Q.; CARMICHAEL, P.L.; BOEKELHEIDE, K.; ANDERSEN, M.E. Toxicity testing in the 21st century: Defining new risk assessment approaches based on perturbation of intracellular toxicity pathways. **PLoS One**. v.6, e20887-1–e20887-11, 2011.
- BIEDERMAN, J.; MONUTEAUX, M.C.; MICK, E.; WILENS, T.E.; FONTANELLA, J.A.; POETZL, K.M.; FARAONE, S.V. Is cigarette smoking a gateway to alcohol and illicit drug use disorders? A study of youths with and without attention deficit hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**. v.59, p.258–264, 2006.
- BOZARTH, M.A. Evidence for the Rewarding Effects of Ethanol Using the conditioned Place Preference Method. **Pharmacol Biochem Behav**. v.35, n.2, p.485-7, 1990.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 248-254, 1976.
- BRUIJNZEEL, A.W., 2012. Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36 (5), 1418–1441.
- CAMARINI, R.C.; GRIFFIN, C.W.; YANKE, A.B.; BENVINDA ROSALINA SANTOS, B.R.; OLIVE, M.F. Effects of adolescent exposure to cocaine on locomotor activity and extracellular dopamine and glutamate levels in nucleus accumbens of dba/2j mice. **NHI**. v.1193, p.34–42, 2008.
- CARPENTER-HYLAND, E.P.; CHANDLER, L.J. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction. *Pharmacol Biochem Behav.*, v.86, n.2, p.200-208, 2007.
- CARRARA-NASCIMENTO, P.F.; OLIVE, M.F.; CAMARINI, R. Ethanol pre-exposure during adolescence or adulthood increases ethanol intake but ethanol-induced conditioned place preference is enhanced only when pre-exposure occurs in adolescence. *Dev Psychobiol.* 2014 Jan;56(1):36-48. doi: 10.1002/dev.21089.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. QuickStats: Number of Deaths from 10 Leading Causes—National Vital Statistics System, United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2013. Acesso em 15 abril de 2015.

- CLARK, A. et al. Chronic infusion of nicotine can increase operant self-administration of alcohol. *Neuropharmacology*, v. 41, p. 108–117, 2001.
- COHEN, D.R.; CURRAN, T. Fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a *fos*-related antigen. **Molecular and Cellular Biology**. v.8, n.5, p.2063-2069, 1988.
- COSTALL, B.; NAYLOR, R.J.; CANNON, J.G.; LEE, T. Differentiation of the dopamine mechanisms mediating stereotyped behaviour and hyperactivity in the nucleus accumbens and caudate-putamen. **J. Pharm. Pharmacol.** v.29, p.337–342, 1977.
- CUNNINGHAM, C.L.; GREMEL, C.M.; GROBLEWSKI, P.A. Drug-induced conditioned place preference and a version in mice. **Nat Protoc.** v.1, n.4, p.1662-70, 2006.
- CURRAN, E.J.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Psychomotor stimulant and opiate induced *c-Fos* mRNA expression patterns in the rat forebrain: comparisons between acute drug treatment and a drug challenge in sensitized animals. *Neurochem Res.*, v.21, n.11, p.1425-1435, 1996.
- DALIA, A.; WALLACE, L.J. Amphetamine induction of *c-Fos* in the nucleus accumbens is not inhibited by glutamate antagonists. *Brain Res.*, v.694, n.1-2, p.299-307, 1995.
- DE DIOS, M.A.; VAUGHAN, E.L.; STANTON, C.A.; NIAURA, R. Adolescent tobacco use and substance abuse treatment outcomes. **Journal of Substance Abuse Treatment**. v.37, p.17–24, 2009.
- DE JONG, J. G. et al. A single social defeat induces short-lasting behavioral sensitization to amphetamine. **Physiol. Behav.**, v. 83, p. 805-811, 2005.
- DEROCHE-GAMONET,V.; BELIN,D.; PIAZZA, P.V. Evidence for addiction like behavior in therat. **Science**. v.305, p.1014–1017, 2004.
- DICKSON, P. E. et al. Effects of adolescent nicotine exposure and withdrawal on intravenous cocaine self-administration during adulthood in male C57BL/6J mice. **Addiction Biology**, v. 19, n. 1, p. 37–48, 2014.
- DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs Abused by Humans Preferentially Increase Synaptic Dopamine Concentrations in the Mesolimbic System of Freely Moving Rats. **Proc Natl Acad Science USA**. v. 85, p.5274-8, 1988.
- DIETZ, D.M.; SUN, H.; LOBO, M.K.; CAHILL, M.E.; CHADWICK, B.; GAO, V.; KOO, J.W.; DIAS, C. Rac1 is essential in cocaine-induced structural plasticity

- of nucleus accumbens neurons. **Nature Neuroscience**. v.15, p.891-896, 2012.
- DURANTE, A.S.; PUCCI, B.; GUDAYOL, N.; MASSA, B.; GAMEIRO, M.; LOPES, C. Tobacco smoke exposure during childhood: Effect on cochlear physiology. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. v.10, p.5257–5265, 2013.
- DYR, W. et al. Involvement of nicotine acetylcholine receptors in the regulation of alcohol drinking in Wistar rats. *Alcohol and Alcoholism*, v. 34, p. 43-47, 1999.
- EDWARDS, D.C.; SANDERS, L.C.; BOKOCH, G.M.; GILL, G.N. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. **Nat. Cell Biol.** v.1, p.253–259, 1999.
- ESKENAZI, B.; CASTORINA, R. Association of prenatal maternal or postnatal child environmental tobacco smoke exposure and neurodevelopmental and behavioral problems in children. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 12, p. 991–1000, 1999.
- JARVIS, M. J. et al. Assessing smoking status in children, adolescents and adults: Cotinine cut-points revisited. **Addiction**, v. 103, n. 9, p. 1553–1561, 2008.
- GERBER, A. et al. Brand Cigarillos — A Cheap and Less Harmful Alternative to Cigarettes ? Particulate Matter Emissions Suggest Otherwise. p. 428–438, 2015.
- GODDING, V. et al. Does In Utero Exposure to Heavy Maternal Smoking Induce Nicotine Withdrawal Symptoms in Neonates? **Pediatric Research**, v. 55, n. 4, p. 645–651, 2004.
- GOODWIN, R. D. et al. Drug Use , Abuse , and Dependence and the Persistence of Nicotine Dependence. v. 16, n. 12, p. 1606–1612, 2014.
- GRAY, K.M.; RIGGS, P.D.; MIN, S.J.; MIKULICH-GILBERTSON, S.K.; BANDYOPADHYAY, D.; WINHUSEN, T. Tobacco and cannabis use trajectories among adolescents in treatment for attention deficit/hyperactivity disorder and substance use disorders. **Drug and Alcohol Dependence**. v.117, p.242–247, 2011.
- GRAYBIEL, A.M. Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. **Curr Opin Neurobiol.**, v.5, n.6, p.733-741, 1995, Review.

- GUINDON, G.E.; PAST, B.D. Current and Future Trends in Tobacco Use. Washington DC: The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, p.13–16, 2003.
- HAILE, C. N.; GRANDPRE, T.; KOSTEN, T. A. Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. **Psychopharmacology**, v. 154, p. 213-220, 2001.
- HALPAIN, S. Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? **Trends Neurosci.** v.23, p.141–146, 2000.
- HAMILTON, T.J.; WHEATLEY, B.M.; SINCLAIR, D.B.; BACHMANN, M., LARKUM, M.E.; COLMERS, W.F. Dopamine modulates synaptic plasticity in dendrites of rat and human dentate granule cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.107, n.42, p.18185–18190, 2010.
- HENNINGFIELD, J.E.; STAPLETON, J.M.; BENOWITZ, N.L.; GRAYSON, R.F.; LONDON E.D. Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. **Drug Alcohol Depend.** v.33, p.23-29, 1993.
- HINSON, R. E.; POULOS, C. X. Sensitization to the behavioral effects of cocaine: Modification by Pavlovian conditioning. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 15, n. 4, p. 559–562, 1981.
- HOPE, B.T.; NYE, H.E.; KELZ, M.B.; IADAROLA, M.J.; NAKABEPPU, Y.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. Induction of a Long- Lasting Ap-1 Complex Composed of Altered *Fos*-Like Proteins in Brain By Chronic Cocaine and other Chronic Treatments. **Neuron.**, v.13, p.1235-44, 1994.
- HULL, C.L. Principles of behavior. Appleton-Century-Crofts, New York, 1943.
- HUTTENLOCHER, P.R.; DABHOLKAR, A.S. Regional Differences in Synaptogenesis in Human Cerebral Cortex. **The journal of comparative neurology.** v.387, p.167–178, 1997.
- HYMAN, S.E. Addiction to cocaine and amphetamine. **Neuron.**, v.16, p.901–904, 1996.
- IADAROLA, M.J.; DOUGLASS, J.; CIVELLI, O.; NARANJO, J.R. Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization. **Brain Res.**, v.455, p.205-212, 1988.

- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. O controle do tabagismo no Brasil. Disponível em www.inca.gov.br/prevencao/tabagismo/controlebr.html. Acesso em 04 de abril de 2014.
- ITZHAK, Y.; MARTIN, J. L. Effects of cocaine , nicotine , dizocipline and alcohol on mice locomotor activity: cocaine – alcohol cross-sensitization involves upregulation of striatal dopamine transporter binding sites. p. 204–211, 1999.
- JARVIS, M. J. et al. Assessing smoking status in children, adolescents and adults: Cotinine cut-points revisited. **Addiction**, v. 103, n. 9, p. 1553–1561, 2008.
- KEMPPAINEN, H.; HYYTIA, P.; KIIANMAA, K. Behavioral Consequences of Repeated Nicotine During Adolescence in Alcohol-Preferring AA and Alcohol-Avoiding ANA Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 33, n. 2, p. 340-349, 2009.
- KOTA, D. et al. Nicotine Dependence and Reward Differ between Adolescent and Adult Male Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 322, n. 1, p. 399-407, 200
- KROEFF, L. R. et al. Correlates of smoking in pregnant women in six Brazilian cities. **Revista de saude pública**, v. 38, n. 2, p. 261–267, 2004.
- JOYA, X.; MANZANO, C.; ALVAREZ, A.T.; MERCADAL, M.; TORRES, F.; SALAT-BATLLE, J.; GARCIA-ALGAR, O. Transgenerational exposure to environmental tobacco smoke. **Int. J. Environ. Res. Public health**. v.11, p.7261–7274, 2014.
- KANDEL, D. Stages and pathways of drug involvement: Examining the gateway hypothesis. Cambridge, England: Cambridge University. **Press**, 2002.
- KAUER, J.A.; MALENKA, R.C. Synaptic plasticity and addiction. **Nat Rev Neurosci.**, v.8, p.844–858, 2007.
- KIIANMAA, K.; NURMI, M.; NYKANEN, I.; SINCLAIR, J.D. Effect of Ethanol on Extracellular Dopamine in the Nucleus Accumbens of Alcohol-Preferring AA and Alcohol-Avoiding ANA Rats. **Pharmacol Biochem Behav.** v.52, n.1, p.29-34, 1995.
- KOLB, B.; MYCHASIUK. R.; MUHAMMAD, A.; LI, Y.; FROST, D.O.; GIBB, R. Experience and the developing prefrontal cortex. **PNAS**. v.109; p.17186–17193, 2012.

- KOOB, G.F.; SANNA, P.P.; BLOOM, F.E. Neuroscience of addiction. **Neuron.**, v.21, p.467–476, 1998.
- KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug Addiction, Dysregulation of Reward and Allostasis. **Neuropsychopharmacology.**, v. 24, n.2, p.97-129, 2001.
- KOOB, G.F. The neurocircuitry of addiction: implications for treatment. **Clin Neurosci Res.**, v.5, p.89–101, 2005.
- LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, v.227, n.5259, p.680–685, 1970.
- LAW, K. L. et al. Smoking during pregnancy and newborn neurobehavior. **Pediatrics**, v. 111, n. 6 Pt 1, p. 1318–1323, 2003.
- LE, A. D. et al. Nicotine increases alcohol self-administration and reinstates alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology*, v. 168, p. 216, 2003.
- LEE, H.K.; KIRKWOOD, A. AMPA receptor regulation during synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. **Semin Cell Dev Biol.** v.22, n.5, p.514–520, 2011.
- LEOPÉRCIO, W.; GIGLIOTTI, A. Tabagismo e suas peculiaridades durante a gestação: uma revisão crítica. Instituto de Doenças do Tórax da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.
- LÓPEZ-MORENO, J. A. et al. Nicotine in alcohol deprivation increases alcohol operant self-administration during reinstatement. *Neuropharmacology*, v. 47, p. 1036-1044, 2004.
- LEPORE, M.; VOREL, S.R.; LOWINSON J.; GARDNER, E.L. Conditioned Place Preference Induced by Delta-9-Tetrahydrocannabinol: Comparison with Cocaine, Morphine and Food Reward. **Life Science**, v.56, n.(23-24), p.2073-80, 1995.
- LOG, T.; HARTZ, I.; HANDAL, M.; TVERDAL, A.; FURU, K.; SKURTVEIT, S. The association between smoking and subsequent repeated use of prescribed opioids among adolescents and young adults—a population-based cohort study. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety.** v.20, p.90–98, 2011.
- LUO, L.; HENSCH, T.K.; ACKERMAN, L.; BARBEL, S.; JAN, L.Y.; JAN, Y.N. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. **Nature.** v. 379, p.837–840, 1996.
- LUSCHER, C.; BELLONE, C. Cocaine-evoked synaptic plasticity: a key to addiction? **Nat Neurosci.** v.11, n.7, p.737–738, 2008.

- MAN, C.N.; GAM, L.H.; ISMAIL, S.; LAJIS, R.; AWANG, R. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.844, n.2, p.322–327, 2006.
- MALHEIRO, A.C.C.G.C. **Determinação espectrofotométrica da carboxihemoglobina em indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono**. São Paulo, 1991. 125p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- MARGRET, C. P.; LI CHENG, X.; ELBERGER, A. J.; CHAPPELL, T. D.; WATERS, R. S. Prenatal alcohol exposure alters the size, but not the pattern, of the whisker representation in neonatal rat barrel cortex. **Experimental Brain Research**, v.65, p. 167-178, 2005.
- MARTIN, B.J.; NAUGHTON, B.J.; THIRITAMARA-RAJAMANI, K.; YOON, D.J.; HAN, D.D.; DEVRIES, A.C.; GU, H.H. Dopamine transporter inhibition is necessary for cocaine-induced increases in dendritic spine density in the nucleus accumbens. **Synapse**. v.65, p.490–496, 2011.
- MELLO, P.R.; OKAY, T.S.; DORES, E.F.G.C.; BOTELHO, C. Avaliação de um sistema de exposição tabagística passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. **Pulmão RJ**, v.14, n.3, p.228–236, 2005.
- MIYAMOTO, Y.; YAMAUCHI, J.; TANOUE, A.; WU, C.; MOBLEY, W.C. TrkB binds and tyrosine-phosphorylates Tiam1, leading to activation of Rac1 and induction of changes in cellular morphology. **Proc. Natl. Acad. Science.**, v.103, p.10444–10449, 2006.
- MORATALLA, R.; XU, M. TONEGAWA, S.; GRAYBIEL, A.M. Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, n.25, p.14928-14933, 1996a.
- MORATALLA, R.; VALLEJO, M.; ELIBOL, B.; GRAYBIEL, A.M. D1-class dopamine receptors influence cocaine-induced persistente expression of *Fos*-related proteins in striatum. **Neuroreport**, v.8, n.1, p.1-5, 1996b.
- NADAL, R.; SAMSON, H. H. Operant ethanol self-administration after nicotine treatment and withdrawal. *Alcohol*, v. 17, p. 139–147, 1999.

- NARANJO, J.R; MELLSTRÖM, B.; ACHAVAL, M.; SASSONE-CORSI, P.
Molecular pathways of pain: *Fos*/*Jun* mediated activation of a noncanonical AP-1 site in the prodynorphin gene. **Neuron**. v.6, p.607-617, 1991.
- NESTLER, E.J. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. **Neurobiology Learn Memory**. v. 78, p.637-647, 2002.
- NISHINA, H.; SATO, H.; SUZUKI, T.; SATO, M.; IBA, H. Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the *fos* gene family. **The proceedings of the National Academy of Sciences.**, v.87, n.9, p.3619-3623, 1990.
- NOGUCHI, K.; KOWALSKI, K.; TRAUB, R.; SOLODKIN, A.; IADAROLA, M.J.; RUDA, M.A. Dynorphin expression and *Fos*-like immunoreactivity following inflammation induced hyperalgesia are co-localized in spinal cord neurons. **Molec Brain Res.**, v. 10, p.227-233, 1991.
- NOGUCHI, K.; DUBNER, R. ; RUDA, M.A. Preproenkephalin mRNA in spinal dorsal horn neurons is induced by peripheral inflammation and is co-localized with *Fos* and *Fos*-related proteins. **Neuroscience.**, v. 46, p.561-570, 1992.
- NORRHOLM, S.D.; BIBB, J.A.; NESTLER, E.J.; OUIMET, C.C.; TAYLOR, J.R.; GREENGARD, P. Cocaine-induced proliferation of dendritic spines in nucleus accumbens is dependent on the activity of cyclindependent kinase-5. **Neuroscience.**, v.116, p.19–22, 2003.
- O'BRIEN, C.P. Drug Addiction and Abuse. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed. Pregarnon, New York, p.621-42, 2006.
- OH, D.; HAN, S.; SEO, J.; CHOI, J.; GROFFEN, J.; KIM, K.; CHO, Y.S.; CHOI, J.; CHOI, H.S.; SHIN, H.; WOO, J.; WON, H.; PARK, S.K.; KIM, S.Y.; JO, J.; WHITCOMB, D.J.; CHO, K.; KIM, H.; BAE, Y.C.; HEISTERKAMP, N.; CHOI, S.Y.; KIM, E. Regulation of synaptic Rac1 activity, long-term potentiation maintenance, and learning and memory by BCR and ABR Rac GTPase-activating proteins. **J. Neurosci.** v.30, p.14134–14144, 2010.
- OLADEHIN, A.; MARGRET, C. P.; MAIER, S. E.; LI CHENG, X.; JAN, T. A.; CHAPPELL, T. D.; WATERS, R. S. Early postnatal alcohol exposure reduced the size of vibrissal barrel field in rat somatosensory cortex (SI) but did not disrupt barrel field organization. **Alcohol**. v. 41, p. 253-261, 2007.

- PENZES, P.; JONES, K. A. Dendritic spine dynamics a key role for kalirin-7. **Trends Neurosci.** v.31, p.419–427, 2008.
- PICCIOTTO, M.R.; ZOLI, M.; RIMONDINI, R.; LÉNA, C.; MARUBIO, L.M.; MERLO PICH, E.; FUXE, K.; CHANGEUX, J.P. Acetylcholine receptors containing the beta-2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. **Nature.** v.391, p.173–177, 1998.
- PICCIOTTO, M.R.; CALDARONE, B.J.; KING, S.L.; ZACHARIOU, V. Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. **Neuropsychopharmacology.** v.22, p.451–465, 2000.
- PICCIOTTO, M.R.; KENNY, P.J. Molecular mechanisms underlying behaviors related to nicotine addiction. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v.3, n.1, 2013.
- PICH, E.M.; PAGLIUSI, S.R.; TESSARI, M.; TALABOT-AYER, D.; HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.; CHIAMULERA, C. Common Neural Substrates for the Addictive Properties of Nicotine and Cocaine. **Science.** v.3, n.275, p.83-86, 1997.
- PILDERVASSER, J.V.N.; ABRAHÃO, P.K.; SOUZA-FORMIGONI, M.L.O. Distinct behavioral phenotypes in ethanol-induced place preference are associated with different extinction and reinstatement but not behavioral sensitization responses. **Frontiers in Behavioral Neuroscience.** v.8, n.267, p.10-12, 2014.
- PLANETA, C.S.; AIZENSTEIN, M.L.; SCAVONE, C.; DELUCIA, R. Reinforcing Properties of Fencamfamine: Involvement of Dopamine and Opioid Receptor. **Pharmacology Biochem Behav.** v. 50, p.35-40, 1995.
- PRASAD, B. M.; ULIBARRI, C.; SORG, B. A. Stress-induced cross-sensitization to cocaine: effect of adrenalectomy and corticosterone after short- and long-term withdrawal. **Psychopharmacology**, v. 136, p. 24-33, 1998.
- RISINGER, F.O.; OAKES, R.A. Nicotine-Induced Conditioned Place Preference and Conditioned Place Aversion in Mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 51, n.2-3, p.457-461, 1995.
- ROBERTO, P. et al. Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. v. 14, n. 3, p. 228–236, 2005.
- ROBBINS, S. J.; EHRMAN, R. N. Designing studies of drug conditioning in humans. *Psychopharmacology (Berlin)*, 106, 143–153, 1992.

- ROBINSON, T.E.; BECKER, J.B. Enduring Changes in Brain and Behavior Produced by Chronic Amphetamine Administration: A Review and Evaluation of Animal Models of Amphetamine Psychosis. **Brain Res Rev.**, v. 396, p.157-198, 1986.
- ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. The Neural Basis of Drug Craving: an Incentive-Sensitization Theory of Addiction. **Brain Res Rev.**, v.18, n.3, p.247-291, 1993.
- ROBINSON, T. E.; BROWMAN, K. E.; CROMBAG, H. S.; BADIANI, A. Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, 22, 347–354, 1998.
- ROBINSON, T. E.; KOLB, B. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. **Eur. J. Neurosci.**, v.11, p. 1598–1604, 1999.
- ROBINSON TE, KOLB B. Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. **Synapse**, v. 33, n.2, p.160–162, 1999.
- ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. **Addiction**, v. 95, n. 8s2, p. 91–117, 2000.
- ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. Incentive-Sensitization and Addiction. **Addiction**, v. 96, p.103-114, 2001.
- ROBINSON, T. E.; GRAZYNA G.; MITTON, E.; KOLB, B. Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. **Synapse**, v.39, p.257–266, 2001.
- ROBINSON, T.E.; KOLB, B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. **Neuropharmacology**, v. 47, p.33–46, 2004. Confirmary
- RODGMAN, A.; PERFETTI, T. A. The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke 2nd ed., **CRC Press**, Boca Raton, FL, 2013.
- ROEMER, E. et al. Mainstream smoke chemistry and in vitro and in vivo toxicity of the reference cigarettes 3R4F and 2R4F. **Beitrage zur Tabakforschung International/ Contributions to Tobacco Research**, v. 25, n. 1, p. 316–335, 2012.

- ROSE, J.E. Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. **Psychopharmacology** 184, 274–285, 2006.
- ROUGÉ-PONT, F. et al. Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 7189- 7195, 1995.
- RUSSO SJ, WILKINSON MB, MAZEI-ROBISON MS, DIETZ DM, MAZE I, KRISHNAN V, RENTHAL W, GRAHAM A, BIRNBAUM SG, GREEN TA, ROBISON B, LESSELYONG A, PERROTTI LI, BOLANOS CA, KUMAR A, CLARK MS, NEUMAIER JF, NEVE RL, BHAKAR AL, BARKER PA, NESTLER EJ. Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. **J Neurosci.**, v.29, n.11, p.3529–3537, 2009.
- SALMINEN, O.; LAHTINEN, S.; AHTEE, L. Expression of *Fos* protein in various rat brain areas following acute nicotine and diazepam. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.54, n.1, p.241-248, 1996.
- SALMINEN, O.; SEPPA, T.; GADDNAS, H.; AHTEE, L. The effects of acute nicotine on the metabolism of dopamine and the expression of *Fos* protein in striatal and limbic brain areas of rats during chronic nicotine infusion and its withdrawal. **J.Neurosci.**, v.19, n.18, p.8145-8151, 1999.
- SAMET, J.M.; YOON, S.Y. Women and the Tobacco Epidemic: Challenges for the 21st Century. Geneva: World Health Organization, 2001.
- SCHNUR, P.; BRAVO, F.; TRUJILLO, M. Tolerance and sensitization to the biphasic effects of low doses of morphine in the hamster. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 19, n. 3, p. 435–439, 1983.
- SEN, S.; PELTZ, C.; BEARD, J.; ZENO, B. Recurrent carbon monoxide poisoning from cigarette smoking. **Am J Med Sci. Nov**; 340(5):427-8, 2010.
- SEPPA, T.; SALMINEN, O.; MOED, M.; AHTEE, L. Induction of Fos-immunostaining by nicotine and nicotinic receptor antagonists in rat brain. **Neuropharmacol.**, v.41, n.4, p.486-495, 2001.
- SHARPE, A. L.; SAMSON, H. H. Repeated nicotine injections decrease operant self- administration. **Alcohol**, v. 28, p. 1–7, 2002.
- SHEN, H.W.; TODA, S.; MOUSSAWI, K.; BOUKNIGHT, A.; ZAHM, D. KALIVAS, P.W. Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. **J. Neurosci.**, v. 29, p.2876–2884, 2009.

- SHIM, I.; JAYALID, J.I.; WIRTSHAFTER, D.; JANG, S.Y.; SHIN, K.H.; LEE, H.J.; CHENG, Y.C.; CHUN, B.G. Nicotine-induced behavioral sensitization is associated with extracellular dopamine release and expression of c-Fos in the striatum and nucleus accumbens of the rat. **Behav Brain Res.**, v.121, n.1-2, p.137-147, 2001.
- SHIRAZI, F. S.; KELE, J.; VILAR, M.; PARATCHA, LEDDA, G. F. Tiam1 as a signaling mediator of nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. **PLoS ONE**, v. 5, n.9647, 2010.
- SHOAIB, M.; STOLERMAN, I.P.; KUMAR, R.C. Nicotine-Induced Place Preferences Following Prior Nicotine Exposure in Rats. **Psychopharmacology**, v. 113, n.3-4, p.445-452, 1994.
- SLOTKIN, T.A. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. **Neurotoxicol. Teratol.** 24, 369–384, 2002.
- STEWART, J., & VEZINA, P. Extinction procedures abolish conditioned stimulus control but spare sensitized responding to amphetamine. **Behavioural Pharmacology**, 2, 65–71, 1991.
- STOLERMAN, I. P.; JARVIS, M. J. The Scientific Case that Nicotine is Addictive. **Psychopharmacology**, v.117, p.2-10, 1995.
- SUN, X.; ZHAO, Y.; WOLF, M.E. Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. **J Neurosci.**, v.25, n.32, p.7342–7351, 2005.
- TANDA, G.; PONTIERI, F.E.; DI CHIARA, G. Contribution of Noradrenaline Carrier to the Increase of Extracellular Dopamine in the Rat Prefrontal Cortex by Amphetamine and Cocaine. **Eur J Neuroscience.**, v.9, p.2077-2085, 1997.
- TANDA, G.; MUNZAR, P.; GOLDBERG, S.R. Self-Administration Behavior Is Maintained by the Psychoactive Ingredient of Marijuana in Squirrel Monkeys. **Nat Neuroscience.**, v. 3, n.11, p.1073-1074, 2000.
- TATEM, K. S. et al. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. **Journal of Visualized Experiments**, n. 91, p. e51785, 2014.
- TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm : update of the last decade **TABLE OF CONTENTS.** p. 227–462, 2007.

- THOMAS, M. J.; KALIVAS, P. W.; SHAHAM, Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. n. December 2007, p. 327–342, 2008.
- THOMAS, M.J.; KALIVAS, P.W.; SHAHAM, Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. **Br J Pharmacol.**, v.154, n.2, p.327–342, 2008.
- TIMBERLAKE, D. S.; HABERSTICK, B. C.; HOPFER, C. J.; BRICKER, J.; SAKAI, J. T.; LESSEM, J. M.; HEWITT, J. K. Progression from marijuana use to daily smoking and nicotine dependence in a national sample of U.S. adolescents. *Drug and Alcohol Dependence*, 88, 272–281, 2007.
- TODA, S.; SHEN, H.W.; PETERS, J.; CAGLE, S.; KALIVAS, P.W. Cocaine increases actin cycling: effects in the reinstatement model of drug seeking. **J. Neurosci.**, v. 26, 1579–1587, 2006.
- TODA, S.; SHEN, H.; KALIVAS, P.W. Inhibition of actin polymerization prevents cocaine-induced changes in spine morphology in the nucleus accumbens. **Neurotox. Res.**, v.18, p.410–415, 2010.
- TODTENKOPF, M.S.; MIHALAKOPOULOS, A.; STELLAR, J.R. Withdrawal duration differentially affects *c-fos* expression. In the medial prefrontal cortex and discrete subregions of the nucleus accumbens in cocaine-sensitized rats. **Neurosci.**, v.114, n.4, p.1061-1069, 2002.
- TORRES, G.; RIVIER, C. Differential effects of intermitente or continuous exposure to cocaine on the hypothalamic-pituitary-adrenal axix and *c-Fos* expression. **Brain Res.**, v.571, n.2, p.204-211, 1992.
- TORRES, L.H.L.; MOREIRA, W.L.; TAMBORELLI GARCIA, R.C.; ANNONI, R.; NICOLETTI CARVALHO, A.L.; TEIXEIRA, S.A.; PACHECO-NETO, M.; MUSCARÁ, M.N.; CAMARINI, R.; MELO LOUREIRO, A.P.; YONAMINE, M.; MAUAD, T.; MARCOURAKIS, T. Environmental tobacco smoke induces oxidative stress in distinct brain regions of infant mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, v.75, n.16/17, p.971–980, 2012.
- TORRES-PACHECO, L.H.L. **Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos BALB/c expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal**. 2013. 141 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

- UHL, G.R.; GROW, R.W. The burden of complex genetics in brain disorders. **Arch Gen Psychiatry**, v.61, n.3, p.223-229, 2004.
- VAGLENOVA, J.; BIRRU, S.; PANDIELLA, N.M.; BREESE, C.R. An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. **Behavioural Brain Research**, v.150, n.1/2, p.159-170, 2004.
- VEENEMAN, M.M.; BROEKHOVEN, M.H.; DAMSTEEGT, R.; VANDERSCHUREN, L.J. Distinct contributions of dopamine in the dorsolateral striatum and nucleus accumbens shell to the reinforcing properties of cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v.37, p.487-498, 2012.
- VESLEY, A.; TAKEUCHI, A.; RUCKER, J. Effect of ventilation on CO clearance in humans. *Am J Resp Crit Care Med*, v. 159, 1999.
- VEZINA, P.; SPRAGUE-DAWLEY, H. D , Dopamine Sensitization Receptor Activation Is Necessary for the Induction by Amphetamine in the Ventral Tegmental Area. v. 76, n. 7, 1996.
- VILLÉGIER, A.S., GALLAGER, B., HESTON, J., BELLUZZI, J.D., LESLIE, F.M. Age influences the effects of nicotine and monoamine oxidase inhibition on mood-related behaviors in rats. **Psychopharmacol.** (Berl.) 208, 593-601, 2010.
- WEBER, D.N. Mechanisms of behavioral toxicology: an integrated approach. **American Zoologist**, v.37, n.4, p.343-345, 1997.
- WISE, R. A; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological review**, v. 94, n. 4, p. 469-492, 1987.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, 2011.
- YANG, N.; HIGUCHI, O.; OHASHI, K.; NAGATA, K.; WADA, A.; KANGAWA, K.; NISHIDA, E.; MIZUNO, K. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. **Nature**, v.393, p.809-812, 1998.
- ZHANG, D.; ZHANG, L.; TANG, Y.; ZHANG, Q.; LOU, D.; SHARP, F.R.; ZHANG, J.; XU, M. Repeated cocaine administration induces gene expression changes through the dopamine D1 receptors. **Neuropsychopharmacology**, v.30, p.1443-1454, 2006.

Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 89.2014-P478

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Exposição à fumaça de cigarro no início do período pós-natal: predisposição à dependência de drogas de abuso na adolescência**" (Protocolo CEUA/FCF/478), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Tatiana Costa Andrioli**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Tania Marcourakis**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **12 de setembro de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 15 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 9127370/1 - Tatiana Costa Andrioli

Email: tatiana.andrioli@usp.br
Data de Nascimento: 14/01/1988
Cédula de Identidade: RG - 35.055.332-4 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmácia - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Mestrado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 01/07/2014
Início da Contagem de Prazo: 01/07/2014
Data Limite para o Depósito: 02/01/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Tania Marcourakis - 01/07/2014 até o presente. Email: tmarcour@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Larissa Helena Lôbo Tôrres Pacheco - 10/09/2014 até o presente. Email: laristorres@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 01/07/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 03/08/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 01/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/07/2016

Impresso em: 04/08/2016 08:19:10

9141 - 9127370/1 - Tatiana Costa Andrioli

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803-3/4	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	05/08/2014	18/08/2014	30	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5802-3/5	Tópicos Avançados em Toxicologia I	05/08/2014	17/11/2014	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5818-1/2	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	29/09/2014	02/11/2014	45	3	100	A	N	Concluída
BMB5718-10/2	Progressos em Neurociência (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	09/03/2015	29/06/2015	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/5	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	24/03/2015	06/04/2015	30	2	100	A	N	Concluída
BMB5795-4/4	Neurociência Básica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	30/04/2015	08/07/2015	120	8	100	A	N	Concluída
VPT5729-7/1	Métodos Estatísticos Aplicados ao Cálculo da Toxicidade (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	21/09/2015	01/11/2015	90	6	90	A	N	Concluída
FBA5728-4/1	Aprimoramento Pedagógico	03/11/2015	30/11/2015	60	4	97	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação Para depósito da dissertação		
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:	
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.	
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.	

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/07/2016

Impresso em: 04/08/2016 08:19:10

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 9127370/1 - Tatiana Costa Andrioli

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
1754705	Tania Marcourakis	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/07/2016

Impresso em: 04/08/2016 08:19:10