



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**PATRICIA XAVIER LIMA GOMES**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO GÊNERO E IDADE NAS ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELO  
ABRASAMENTO POR NICOTINA EM RATOS**

**FORTALEZA/CE**

**2011**

**PATRICIA XAVIER LIMA GOMES**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO GÊNERO E IDADE NAS ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELO  
ABRASAMENTO POR NICOTINA EM RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia do Sistema Nervoso Central.

Orientadora: Dra. Danielle Silveira Macêdo

**FORTALEZA/CE**

**2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

G626e Gomes, Patricia Xavier Lima.

Estudo da influência do gênero e idade nas alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo abrasamento por nicotina em ratos / Patricia Xavier Lima Gomes. – 2011.

80 f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

Área de Concentração: Farmacologia do Sistema Nervoso Central.

Orientação: Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo.

1. Estresse Oxidativo. 2. Nicotina. 3. Convulsões. I. Título.

---

CDD 616.853

**PATRICIA XAVIER LIMA GOMES**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO GÊNERO E IDADE NAS ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELO  
ABRASAMENTO POR NICOTINA EM RATOS**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada: 19.08.2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dr. André Férrer Carvalho  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa.Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Universidade Federal do Ceará

*À minha mãe, por todas as renúncias, em prol  
de mais um degrau atingido em minha vida;  
por todas as orações, algumas nas quais  
desacreditei, por todas as suas palavras de fé  
e 'siga em frente', que me fizeram chegar até  
aqui.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a oportunidade de ter nascido em uma família simples, mas com valores fortes que contribuíram para a formação de meu caráter, e por ter sempre colocado em meu caminho pessoas que só tiveram a agregar.

À minha mãe, minha musa inspiradora de fé, coragem, persistência e que mesmo diante das dificuldades, me ensinou a enfrentá-las com um simples sorriso no rosto. Àquela que esteve comigo em momentos de felicidade e angústia, que me ensinou a caminhar com as próprias pernas e a correr atrás dos sonhos. À minha maior incentivadora nesta vida acadêmica. À melhor mãe do mundo!

Ao meu pai, que embora a sua presença ausente, torce muito por mim e vibra com as conquistas de sua primogênita.

Aos meus irmãos, Evandro Júnior e Ana Karolinne pelos inúmeros momentos de risadas e brigas que fazem parte da nossa convivência fraternal e que eu tanto valorizo.

Ao meu namorado Marcelo, por estar verdadeiramente ao meu lado, dispensando seu amor e carinho e me compreendendo nos momentos de ausência. Trouxe-me a maturidade que eu necessitava.

À minha eterna professora e mais que orientadora Danielle Macêdo, um anjo que Deus pôs em minha vida, que, apesar de tão jovem, com sua sabedoria me ensina a cada dia lições de humildade, convivência e mais que tudo reproduz os seus conhecimentos de forma tão espetacular. Uma das pessoas mais célebres que já conheci e uma grande pesquisadora (que me espelho)!

Ao meu braço direito e esquerdo, Gersilene Valente e Fernanda Yvelize, por terem me acolhido de braços abertos em suas vidas, por terem transformado os experimentos tão mais atrativos, por deixarem a vida acadêmica mais alegre e divertida!

À professora Nylane Maria Nunes de Alencar por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao professor André Ferrér Carvalho por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho e também por ter compartilhado suas idéias para a execução do mesmo.

Ao professor Hélio por ter aceitado participar da banca examinadora como suplente.

Às professoras Silvânia Vasconcelos e Cléa Florenço pela disponibilidade do laboratório e transferência de conhecimentos.

Aos demais professores da Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará que tive a oportunidade de conhecer e absorver o conhecimento repassado.

Aos meus colegas que fazem parte da grande Neuro: Márcia Calheiros, Taciana, Dayane, Eduardo, Sarah, Rafaela, Alyne Mara, Leonardo, Mariana, Nayrton, Emiliano, Edith, Camila Nayane, Kelly Rose, Cerqueira, Natália, Luciana Belchior, Ana Paula, Carolina Melo, pelos momentos de descontração e troca de conhecimentos.

Aos técnicos do Laboratório de Neurofarmacologia: Vilani, Arnaldo e Lena, pela ajuda dada nos experimentos.

Às secretárias da Pós-graduação: Dona Áurea e Márcia pela dedicação destinada a esta instituição e assim, sempre facilitando a vida dos alunos do Departamento de Pós-graduação em Farmacologia da UFC.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho encerramento de mais um ciclo em minha vida.

Meu muito Obrigada!

“Enquanto mais me aprofundo nas ciências,  
mais me aproximo de Deus.”

*Albert Einstein*

## RESUMO

O abrasamento é um modelo experimental bem conhecido de epilepsia progressiva, induzida por estimulação sublimiar elétrica ou química. Apenas recentemente o abrasamento induzido por nicotina (NIC) foi caracterizado farmacologicamente e histologicamente. Além disso, é sabido que diferenças de gênero e de idade na susceptibilidade à convulsão são uma das questões mal resolvidas na epilepsia. Baseado nestes fatos, o presente estudo objetivou investigar a influência do gênero e idade nas alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo abrasamento por nicotina em ratos. Ratos Wistar machos e fêmeas periadolescente (35-37 dias; n=8 por grupo) e adultos (73-75 dias; n=8 por grupo) foram usados. Durante 4 semanas foi realizada a administração repetida de NIC 2,0 mg/kg, intraperitonealmente, de segunda à sexta-feira e as convulsões avaliadas de acordo com a escala de Racine. Trinta minutos após a última administração de NIC (25º dia), os animais foram eutanasiados, córtex pré-frontal (CPF), corpo estriado (CE) e hipocampo (HC) dissecados e homogenatos a 10% preparados com tampão fosfato de potássio (pH 7,4). Os homogenatos foram usados para avaliar a atividade da SOD, quantificação dos níveis de GSH, de nitrito/nitrato (como maneira indireta de determinar o óxido nítrico) e a formação de peróxidos lipídicos pela mensuração das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Fêmeas periadolescentes e adultas e machos adultos apresentaram a mesma susceptibilidade ao desenvolvimento do abrasamento quando comparado aos ratos machos periadolescentes, apresentando estágio 5 de convulsões após 19 dias de tratamento de NIC, enquanto os ratos machos periadolescentes apresentaram estágio 5 apenas após 24 dias de administração. Com relação às mortes as fêmeas periadolescentes foram mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da NIC com 75% de mortes neste grupo. Os machos periadolescentes apresentaram um aumento dos níveis de GSH no CPF e CE e nenhuma alteração na atividade da SOD, conteúdo de nitrito e peroxidação lipídica. Ao contrário, os outros grupos diminuíram os níveis de GSH e a atividade da SOD, com dano na membrana detectado pela elevação na peroxidação lipídica em machos adultos e fêmeas periadolescentes, mas não em fêmeas adultas. Em conclusão, nossos resultados demonstram que o abrasamento induzido por NIC é influenciado pelo gênero e idade do animal e que parâmetros de estresse oxidativo, estão relacionados, pelo menos em parte, à susceptibilidade/resistência do animal às convulsões induzidas por esta droga.

*Palavras-chave: abrasamento induzido por nicotina, estresse oxidativo, gênero e idade*

## ABSTRACT

Kindling is a well-known experimental model of progressive epilepsy induced by electrical or chemical subthreshold stimulation. Only recently nicotine-induced kindling was pharmacologically and histologically characterized. Furthermore is known sex and age differences in seizure susceptibility are one of the unresolved issues in epilepsy. Based on this, the present study aimed to investigate gender and age influences in behavioral and neurochemical changes nicotine-induced kindling in rats. Male and Female periadolescent (35-37 days old, n= 8/group) and adult (73-75 days old, n=8/group) Wistar rats were used. During 4 weeks, kindling seizures were induced by repeated administration of NIC 2.0 mg/kg, intraperitoneally, from Monday to Friday. Convulsant activity was evaluated according Racine scale. Thirty minutes after the last administration of NIC, animals were euthanized, prefrontal cortex (PFC), striatum (ST) and hippocampus (HC) dissected and homogenates to 10% prepared with potassium phosphate buffer (pH 7.4). Finally, homogenates were used to evaluate Superoxide Dismutase (SOD) activity, levels Glutathione Reduced (GSH) quantifying, nitrite/nitrate levels (as an indirect way to determine nitric oxide) and lipid peroxides formation by measuring the thiobarbituric-acid reacting substances (TBARS). Female periadolescent and adult and male adult presented same susceptibility to kindling development when compared to male periadolescent, presented stage 5 seizures after 19 days NIC treatment, whereas male periadolescent rats presented stage 5 only after 24 days of administration. Regarding to deaths female periadolescent were more susceptible to toxic effects of NIC with 75% deaths in this group. Male periadolescent presented an increase in the GSH levels in CPF e CE and no change in SOD activity, nitrite content and lipid peroxidation. Unlike, other groups decreased GSH levels and SOD activity with membrane damage detected by an increase in lipid peroxidation in male adult and female periadolescent, but not in female adult animals. In conclusion, our results demonstrate that NIC-induced kindling is influenced by gender and age and oxidative stress parameters, are related, at least in part, to the animal's susceptibility/resistance to the kindling induced by this drug.

*Key-words: nicotine-induced kindling, oxidative stress, sex and age*

## ABREVIATURAS

$\mu$ amp – microampere

$\mu$ l – microlitro

$\mu$ M – micromolar

$^{\circ}$ C – grau Celsius

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

AMPA – ácido  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazole-propionico

ATV – área tegmental ventral

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

$\text{Ca}^{2+}$  – cálcio

CE – corpo estriado

CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CPF – córtex pré-frontal

CYP 450 – citocromo P 450

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTNB – ácido 5,5-ditiobis (2- nitrobenzóico)

EDTA – ácido tetraacético etilenodiamina

EEG – eletroencefalograma

ERO – Espécies Reativas ao Oxigênio

ERN – Espécies Reativas ao Nitrogênio

ELT – Epilepsia do Lobo Temporal

g – grama

GABA – ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GSH – Glutathiona Reduzida

GPx – Glutathiona Peroxidase

GR – Glutathiona Redutase

i.p - intraperitoneal

h – hora

HC – hipocampo

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

Kg - quilograma

MDA – malonildilaldeído

mg – miligrama  
min – minuto  
mL – mililitro  
mM – milimolar  
n° – número  
NAC – núcleo accumbens  
NADPH – fosfato dinucleotídico de nicotinamida e adenina  
NBT – nitro-blue-tetrazólio  
NEED – N-1-naftiletilenodiamina  
NIC – nicotina  
nm – nanômetro  
nM – nanomolar  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
NO – Óxido Nítrico  
eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial  
iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzida  
nNOS – Óxido Nítrico Sintase neuronal  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PD – pós-descarga  
pH – potencial hidrogeniônico  
RNA – ácido ribonucléico  
rpm – rotação por minuto  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SOD – Superóxido Dismutase  
TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Classificação Internacional de doenças e problemas à Saúde</b>	<b>18</b>
<b>Figura 2: Estruturas do sistema límbico</b>	<b>19</b>
<b>Figura 3: Localização do complexo amigdalóide no rato.</b>	<b>21</b>
<b>Figura 4: Espécies vegetais que dão origem à nicotina.</b>	<b>23</b>
<b>Figura 5: Estrutura química da nicotina.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 6: Exemplos de formação enzimática de ERO.</b>	<b>31</b>
<b>Figura 7: Esquema de desativação enzimática das ERO.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 8: Desenvolvimento do abasamento induzido por nicotina em ratos machos e fêmeas, periadolescentes e adultos, de acordo com o estágio 5 da escala de convulsão de Racine (1972).</b>	<b>41</b>
<b>Figura 9: Percentual de sobrevivência dos animais submetidos ao abasamento induzido por nicotina.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 10: Atividade da enzima Superóxido Dismutase no <u>córtex pré-frontal</u> de animais submetidos ao abasamento por nicotina.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 11: Atividade da enzima Superóxido Dismutase no <u>corpo estriado</u> de animais submetidos ao abasamento por nicotina.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 12: Atividade da enzima Superóxido Dismutase no <u>hipocampo</u> de animais submetidos ao abasamento por nicotina.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 13: Níveis de Glutathione Reduzida em <u>córtex pré-frontal</u> de animais submetidos ao abasamento induzido por nicotina.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 14: Níveis de Glutathione Reduzida em <u>corpo estriado</u> de animais submetidos ao abasamento induzido por nicotina.</b>	<b>49</b>
<b>Figura 15: Níveis de Glutathione Reduzida em <u>hipocampo</u> de animais submetidos ao abasamento induzido por nicotina.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 16: Níveis de Nitrito em <u>córtex pré-frontal</u> de animais submetidos ao abasamento induzido por nicotina.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 17: Níveis de Nitrito em <u>corpo estriado</u> de animais submetidos ao abasamento induzido por nicotina.</b>	<b>53</b>
<b>Figura 18: Níveis de Nitrito em <u>hipocampo</u> de animais submetidos ao abasamento induzido por nicotina.</b>	<b>54</b>
<b>Figura 19: Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) em <u>córtex</u></b>	

<b><u>pré-frontal</u> de animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina.</b>	<b>56</b>
<b>Figura 20: Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) em <u>corpo estriado</u> de animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina.</b>	<b>57</b>
<b>Figura 21: Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) em <u>hipocampo</u> de animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina.</b>	<b>58</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Epilepsia do Lobo Temporal e o Abrasamento</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Aspectos fisiológicos do abrasamento</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1 Histórico</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2 Mecanismos celulares gerais envolvidos no abrasamento</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Nicotina e o abrasamento</b>	<b>22</b>
<b>1.3.1 Aspectos gerais da nicotina</b>	<b>22</b>
<b>1.3.2 Aspectos farmacológicos da nicotina</b>	<b>24</b>
<b>1.3.3 Efeitos da nicotina no Sistema Nervoso Central</b>	<b>25</b>
<b>1.3.4 Nicotina e Convulsão</b>	<b>26</b>
<b>1.4 Diferenças entre as fases adolescência e a adulta quanto ao envolvimento com nicotina</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Diferenças de gênero quanto ao envolvimento com nicotina</b>	<b>28</b>
<b>1.6 Nicotina e o estresse oxidativo</b>	<b>29</b>
<b>1.7 Relevância e Justificativa</b>	<b>33</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>34</b>
<b>3 MATERIAIS E METODOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Animais</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Droga utilizada</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Estratégia experimental</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Tratamento dos animais e esquema de indução do abrasamento</b>	<b>36</b>
<b>3.5 Determinação do estresse oxidativo em animais induzidos ao abrasamento por nicotina</b>	<b>36</b>
<b>3.5.1 Determinação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) em animais induzidos ao abrasamento por nicotina</b>	<b>37</b>
<b>3.5.2 Quantificação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) em animais induzidos ao abrasamento por nicotina</b>	<b>37</b>
<b>3.5.3 Dosagem de nitrito/nitrato em animais induzidos ao abrasamento por nicotina</b>	<b>38</b>

<b>3.5.4</b>	<b>Avaliação da peroxidação lipídica em animais induzidos ao abrasamento por nicotina</b>	<b>38</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Determinação do desenvolvimento do abrasamento induzido por nicotina em ratos</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)</b>	<b>43</b>
<b>4.3</b>	<b>Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)</b>	<b>47</b>
<b>4.4</b>	<b>Determinação dos níveis de Nitrito/Nitrato</b>	<b>51</b>
<b>4.5</b>	<b>Determinação dos níveis de Peroxidação Lipídica das membranas</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Um modelo experimental comum de epilepsia progressiva é o abrasamento (tradução da palavra inglesa *kindling*). O primeiro conceito de abrasamento descrevia um processo no qual a atividade epileptiforme conhecida como pós-descarga (PD) podia ser desencadeada pela estimulação elétrica ou química de estruturas cerebrais (RACINE; MCLNTYRE, 1986). Goddard (1967) foi o primeiro a demonstrar que o abrasamento de áreas subcorticais, por estímulos de baixa intensidade (50  $\mu$ amp) a intervalos dispersos produziam um aumento na susceptibilidade para crises ou episódios convulsivos pela diminuição do limiar da convulsão. Portanto, o abrasamento resulta em modificações progressivas e duradouras na responsividade neuronal que se manifestam pelo aumento na duração, complexidade e propagação da PD a partir do sítio de estimulação, bem como na progressão previsível da resposta convulsiva que o acompanha (GODDARD; MCINTYRE; LEECH, 1969; RACINE, 1972).

O fenômeno do abrasamento é considerado um importante modelo no estudo da epilepsia, uma vez que foi demonstrado que convulsões induzidas podem tornar-se manifestações comportamentais permanentes (PINEL; ROVNER, 1978), que relembram a gênese e progressão de algumas desordens epilépticas, como a epilepsia do lobo temporal ou, de forma mais apropriada, a convulsão parcial complexa. Como ocorre no abrasamento, este tipo de convulsão tem origem focal, mas subseqüentemente se generaliza, com perda da consciência e, freqüentemente, componentes motores podendo chegar a uma convulsão tônico-clônica generalizada (HANNESSON E CORCORAN, 2000).

O abrasamento pode também ser obtido através de estimulação corneal, bem como de estimulação química repetida, utilizando-se drogas como cocaína, pentilenotetrazol, dentre outras, ou até mesmo pela retirada do etanol.

Porém, quando o abrasamento por quimioconvulsivantes é examinado, independente do causado pela cocaína, a maioria dos outros convulsivantes químicos que induzem abrasamento por injeção sistêmica parecem agir predominantemente no sistema GABAérgico. Contudo no que se refere ao abrasamento induzido por nicotina, pouco de seu mecanismo é conhecido (BASTLUND et al., 2005).

Os modelos de abrasamento em roedores têm contribuído para o conhecimento do efeito da ocorrência de crises epilépticas de curta duração na

fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal (KOTLOSKI et al., 2002; SAYIN et al., 2003) e, além disto, podem ser de maior interesse para o estudo da plasticidade neuronal em geral, visto que as modificações neuronais produzidas pelo abramento podem estar associadas a modificações em funções outras que não somente a epilepsia (funções não-epilépticas) ou comportamentais que dependem dos neurônios afetados (LOSCHER et al., 2003).

### **1.1 Epilepsia do lobo temporal (ELT) e o Abrasamento**

A epilepsia é uma das mais comuns desordens do cérebro, atingindo cerca de 0,5-1% de pessoas no mundo, e cerca de 15% dos pacientes sejam refratários, ou seja, continuam a ter crises, sem remissão, apesar de tratamento adequado com medicamentos anticonvulsivantes (BANERJEE; HAUSER, 2008). A incidência estimada na população ocidental é de 1 caso para cada 2.000 pessoas por ano. A incidência de epilepsia é maior no primeiro ano de vida e volta a aumentar após os 60 anos de idade. A probabilidade geral de ser afetado por epilepsia ao longo da vida é de cerca de 3% (KWAN; SANDER, 2004). É caracterizada por crises epilépticas recorrentes, normalmente não-provocadas, ou seja, não provocadas por febre, insultos agudos do Sistema Nervoso Central (SNC) ou desequilíbrios tóxico-metabólicos graves, como deficiências nutricionais, hipoglicemia, hipocalcemia, encefalopatia urêmica, acarretando em conseqüências cognitivas, psicossociais e sociais desta condição (CHANG; LOWENSTEIN, 2003; ENGEL; PEDLEY, 2008). O termo “epilepsia” encerra uma grande variedade de manifestações clínicas, desde as chamadas auras psíquicas até as crises tônico-clônicas generalizadas, incluindo as epilepsias da infância, as epilepsias secundárias à outras doenças, as epilepsias de origem familiar e muitas outras. De acordo com a Classificação Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde, a epilepsia é classificada em nove diferentes tipos, conforme na figura abaixo (Figura 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

**Figura 1- Classificação Internacional de doenças e problemas à Saúde.**

<b>Classificação Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde</b>	
<b>Código</b>	<b>Tipo (descrição)</b>
G40.0	Epilepsia e síndromes epilépticas idiopáticas definidas por sua localização (focal) (parcial) com crises de início focal
G40.1	Epilepsia e síndromes epilépticas sintomáticas definidas por sua localização (focal) (parcial) com crises parciais simples
G40.2	Epilepsia e síndromes epilépticas sintomáticas definidas por sua localização (focal) (parcial) com crises parciais complexas
G40.3	Epilepsia e síndromes epilépticas generalizadas idiopáticas
G40.4	Outras epilepsias e síndromes epilépticas generalizadas
G40.5	Síndromes epilépticas especiais
G40.6	Crise de grande mal, não especificada (com ou sem pequeno mal)
G40.7	Pequeno mal não especificado, sem crises de grande mal
G40.8	Outras epilepsias

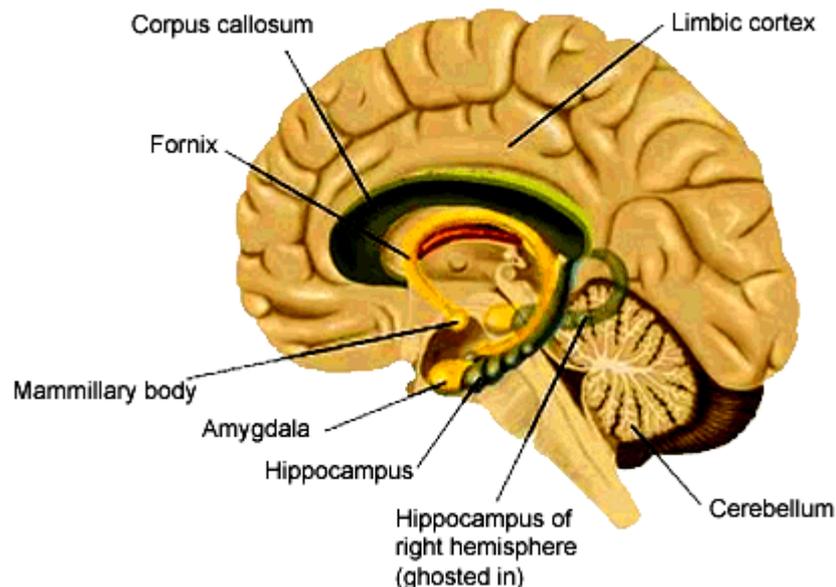
Fonte: Portaria SAS/MS Nº 492, de 23 de setembro de 2010, Ministério da Saúde, Brasil. Acesso em: 15 de outubro de 2011.

Dados epidemiológicos mostram que o tipo mais freqüente de crise em seres humanos é a epilepsia de lobo temporal (ELT), sendo a forma mais comum de epilepsia focal, responsabilizando-se por pelo menos 40-50% de todos os casos desta patologia (YACUBIAN, 2004; GUERREIRO et al., 2000). Este tipo de epilepsia é caracterizado por crises bastante peculiares denominadas “crises parciais complexas”. Os circuitos primariamente envolvidos na ELT incluem estruturas do sistema límbico, particularmente o hipocampo e a amígdala (Figura 2). Essas estruturas participam dos

processos de memória e aprendizado e encontram-se seriamente afetadas na ELT. O achado mais característico da ELT, no homem, é a atrofia hipocampal, decorrente da perda seletiva de neurônios e do processo de gliose que acompanha a perda celular (YACUBIAN, 2004; GUERREIRO et al., 2000).

A esclerose hipocampal refere-se a uma perda neuronal variável e seletiva em CA1 (Setor de Sommer), CA3 e no hilo, que são regiões localizadas no hipocampo, sendo uma das características neuropatológicas mais importantes na ELT (MELDRUM; BRUTON, 1992). Há gliose secundária, ou seja, alteração da substância branca, e atrofia da formação hipocampal que pode atualmente ser identificada através de ressonância magnética de alta resolução. A perda de neurônios hilares do giro denteado geralmente é evidente, sendo por vezes a única anormalidade (nesse caso denominada esclerose do *endfolium*). Em casos mais graves, além da esclerose, há perda neuronal também em locais extra-hipocampais, como córtex entorrinal, giro para-hipocampal, amígdala, tálamo e cerebelo. Entretanto, a perda celular fora do hipocampo não ocorre a menos que haja também perda neuronal nesta área (MARGERISON; CORSELLIS, 1966).

**Figura 2- Estruturas do sistema límbico.**



Fonte: [http://painconsortium.nih.gov/symptomresearch/chapter\\_23/images/fig81v2.gif](http://painconsortium.nih.gov/symptomresearch/chapter_23/images/fig81v2.gif)  
 Acesso: 30.06.2011

A ELT associada a esta esclerose é a principal causa de resistência ao tratamento medicamentoso (refratariedade) em pacientes adultos com epilepsia, tornando-se o tipo predominante e incapacitante (FRENCH et al., 1993).

Para entender as epilepsias, inúmeras abordagens têm sido feitas, tanto pelo estudo do tecido epiléptico após remoção cirúrgica do foco epiléptico, bem como através de estudos dos tecidos cerebrais provenientes de animais de laboratório que são submetidos aos modelos experimentais de epilepsia (MODY; SCHWARTZKROIN, 1997). A alta incidência de refratariedade na ELT em humanos, bem como seu impacto na vida do indivíduo e na sociedade, tem compelido pesquisadores no mundo a estudar sua fisiopatologia, o que torna estes modelos particularmente relevantes e os mais utilizados são aqueles que mimetizam a ELT, como o modelo por pilorcapina (TURSKI et al., 1983), o modelo do ácido caínico (Ben-Ari, 1985) e o abrasamento (GODDARD, 1967).

## **1.2 Aspectos fisiológicos do abrasamento**

O abrasamento, conforme mencionado anteriormente, tem sido usado como um modelo para a epilepsia do lobo temporal e para o entendimento da epileptogênese (processo de desenvolvimento da epilepsia) humana por muitos investigadores por mais de 30 anos, e os resultados têm sido freqüentemente interpretados em termos de suas implicações para a condição humana (BERTRAM, 2007).

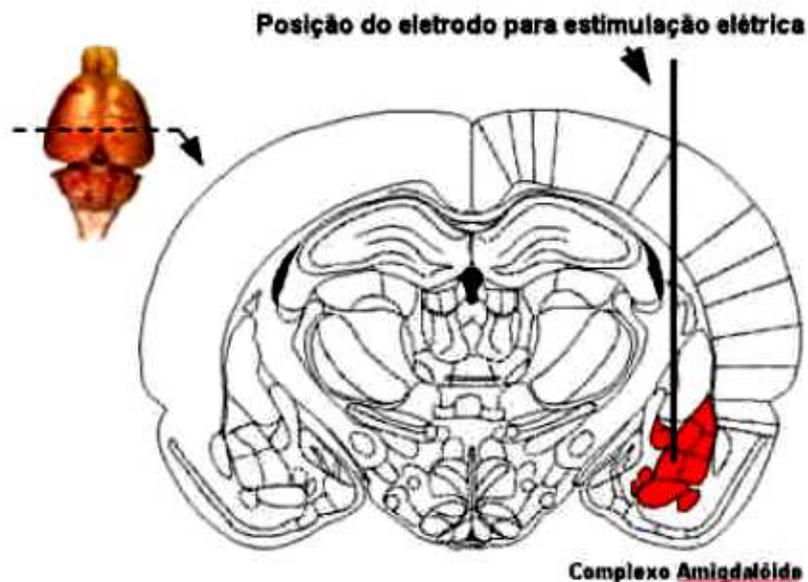
### **1.2.1 Histórico**

O abrasamento ou *kindling* foi descrito em 1967 por Graham Goddard, no qual ele observou que repetidos estímulos excitatórios elétricos e de baixa intensidade (50  $\mu$ amp), aplicados em estruturas cerebrais, acarretavam no aparecimento progressivo de crises comportamentais e detectáveis eletrograficamente, que cresciam e se propagavam induzindo crises motoras generalizadas e uma permanente susceptibilidade às crises epiléticas. Os estímulos eram provenientes da implantação profunda de eletrodos em regiões cerebrais específicas, como a amígdala (Figura 3) ou hipocampo (MCINTYRE et al., 2002; MORIMOTO et al., 2004).

Em décadas recentes muitos outros métodos de abrasamento foram introduzidos na pesquisa, dentre eles o abrasamento corneal (MATAGNE;

KLITGAARD, 1998; POTSCHKA; LOSCHER, 1999) e abrasamento químico por compostos como picrotoxina, bicuculina (NUTT et al., 1982), FG 7142 (LITTLE; NUTT; TAYLOR, 1987), cocaína (ITZHAK, 1996; MILLER et al., 2000; POST; KOPANDA, 1975; POST; WEISS; PERT, 1988) e pentilenotetrazol (ERDTMANN-VOURLIOTIS et al., 1998; LITTLE; NUTT; TAYLOR, 1987; MASON; COOPER, 1972). E mais recentemente um fenômeno similar foi reportado com as convulsões repetidas induzidas pela retirada após intoxicação por etanol (GONZALEZ et al., 2001), mostrando assim que não é apenas o estímulo químico ou elétrico que pode causar abrasamento.

**Figura 3 - Localização do complexo amigdalóide no rato.**



Fonte: [http://www.multiciencia.unicamp.br/img\\_03/artigos/mc\\_fig1.jpg](http://www.multiciencia.unicamp.br/img_03/artigos/mc_fig1.jpg)

Acesso em: 04.07.2011

### 1.2.2 Mecanismos celulares gerais envolvidos no abrasamento

A evolução do processo de abrasamento segue um padrão característico bem definido e tem sido estudado por diferentes pesquisadores (RACINE, 1972). Duas características principais do abrasamento devem ser mantidas em mente: é necessário ter uma convulsão para o abrasamento ocorrer e a convulsão induzida não é espontânea. Este fenômeno é de longa duração, uma vez que, quando o platô é atingido e mantido,

existe uma pequena queda na resposta ao abrasamento após períodos sem estimulação (GODDARD; MCINTYRE; LEECH, 1969; HIYOSHI; WADA, 1992).

A progressão comportamental no desenvolvimento do abrasamento sugere que ele começa com um número limitado de circuitos neuronais e, posteriormente, estende-se para circuitos adicionais, correlacionando-se com o componente comportamental de crises que evoluem para convulsões, ou seja, há recrutamento de outras áreas cerebrais fora do foco estimulado, que são acompanhadas pela progressão do estágio de convulsão comportamental envolvendo clônus unilateral e então bilateral com *rearing* e queda do animal (BERTRAM, 2007; POST, 2007). O aumento da duração destas crises sugere que a resistência existente dos circuitos para a atividade convulsiva está também enfraquecida, mostrando que o abrasamento resulta em mudanças na capacidade do cérebro em limitar as convulsões (BERTRAM, 2007).

Em termos de mecanismo, este fenômeno tem mostrado causar uma facilitação da plasticidade funcional via atividade-dependente, e juntamente a este processo, há uma indução espaço-temporal de genes imediatos como c-fos e de genes efetores tardios incluindo neuropeptídeos, fatores neurotróficos e uma variedade de outros compostos químicos envolvidos na síntese e liberação de neurotransmissores e ação no receptor (POST; WEISS, 1992). Mudanças nas vias de sinalização intracelular, função de neurotransmissores, expressão de canais de íons e morfologia neuronal e ultraestrutural também têm sido correlacionadas (SATO et al., 1996).

Foi observado um aumento dos níveis de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) no hipocampo, hipotálamo, neocórtex e corpo estriado, no qual tem mostrado causar hiperexcitabilidade em cortes hipocampais (SATO et al., 1996); aumento progressivo da densidade do receptor GABA<sub>A</sub> no giro denteado, e *downregulation* aguda evoluindo para *upregulation* deste receptor em CA1 e CA3 (LIU et al., 2009); aumento da expressão de canais iônicos de sódio Nav1.6 em CA3 causando um aumento persistente na corrente de sódio, e provavelmente, contribuindo para a excitabilidade exacerbada (BLUMENFELD et al., 2009).

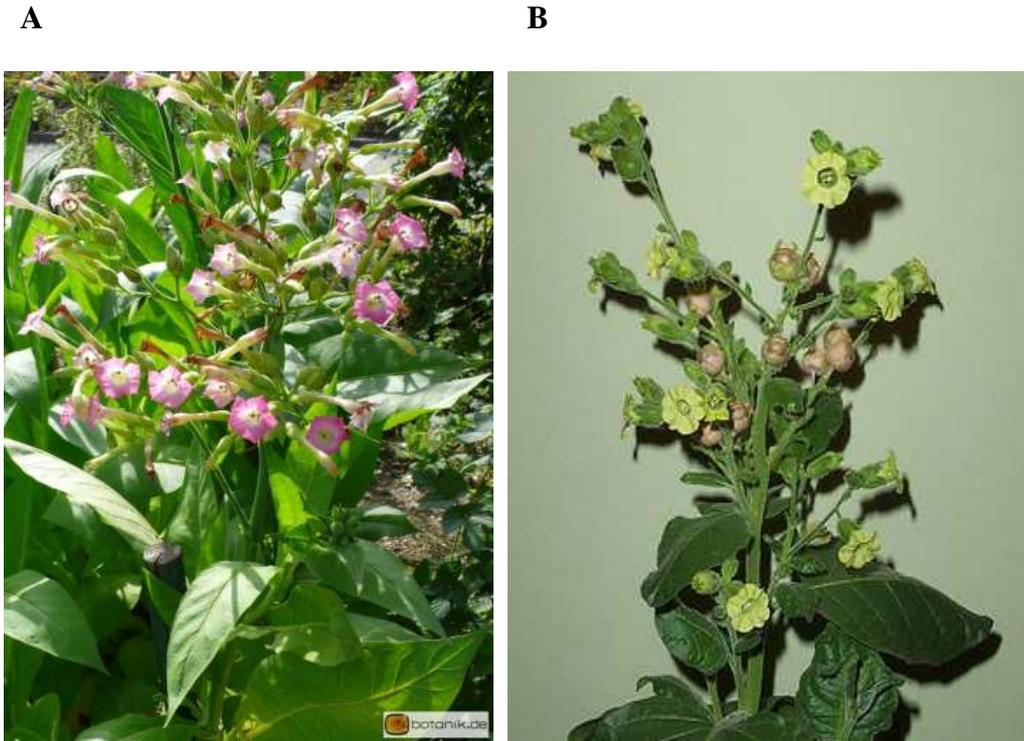
### **1.3 Nicotina e o abrasamento**

#### **1.3.1 Aspectos gerais da nicotina**

A nicotina, um alcalóide natural derivado de duas espécies vegetais, *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana rustica* (Figura 4), foi isolada em 1828 da folha do tabaco por Posselt e Reiman, faz parte da fumaça do cigarro, como um dos seus 4.000 componentes, sendo o mais estudado entre todos (BENOWITZ, 1992).

**Figura 4 - Espécies vegetais que dão origem à nicotina.**

**A** – *Nicotiana tabacum*; **B** – *Nicotiana rustica*



Fontes: <http://www.botanik.de/files/images/Nicotiana%20tabacum.preview.jpg>;  
<http://toxicopoeia.com/botany/plants/image/Nicotiana%20Rustica.jpg>

Acesso em: 05.07.2011

A difusão do tabaco no começo do século XX fez com que seu consumo aumentasse durante a 2ª Grande Guerra Mundial, atingindo o auge nas décadas de 50 e 60. Declinou discretamente em alguns países desde 1970, mas os problemas associados a esse consumo têm estimulado mais pesquisas, pois os dados são alarmantes. Existem mais de 1 bilhão de fumantes no mundo, e a metade deles, se permanecer fumando, morrerá prematuramente (MARQUES et al., 2001).

No Brasil, a proporção de pessoas que já fumaram cigarro na vida é de 41,1%, sendo que as classes de nível socioeconômico mais baixo fumam mais. Cerca de 90% dos fumantes ficam dependentes da nicotina entre os 5 e os 19 anos de idade (atualmente temos aproximadamente 2,8 milhões de fumantes nessa faixa etária), mas a

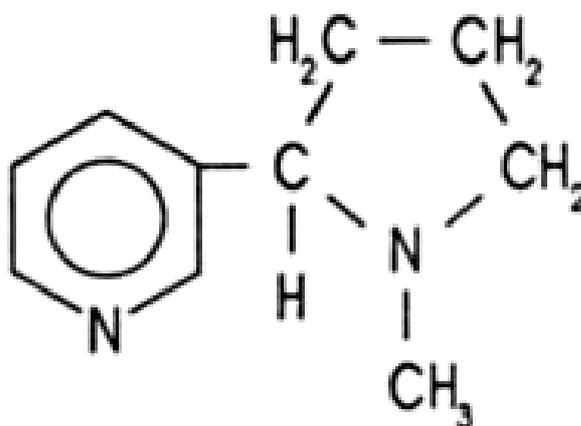
grande concentração de fumantes está na faixa etária, entre 20 a 49 anos de idade. Na região Sul é onde existem mais dependentes: 42% dos habitantes. No Nordeste, são 31%. Os adeptos da nicotina seguem o comportamento idêntico aos dependentes de heroína e cocaína (GALDURÓZ et al., 2005).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que, atualmente, 5,4 milhões de óbitos são atribuídos ao tabagismo no mundo anualmente (WHO, 2002), dos quais 200 mil são no Brasil (WHO, 2008), com uma projeção estimada de óbitos em torno de 10 milhões até o ano 2020, dos quais 7 milhões ocorrerão nos países em desenvolvimento. Vale dizer que o tabagismo, hoje, mata mais que a soma das mortes por AIDS, cocaína, heroína, álcool, suicídios e acidente de trânsito (MARQUES et al., 2001). Entretanto, a indústria do tabaco movimenta centenas de bilhões de dólares ao ano, e tem um poderoso “lobby” político, dificultando assim, o desenvolvimento de medidas preventivas (FOCCHI, 2003).

### 1.3.2 Aspectos farmacológicos da nicotina

A nicotina é uma amina terciária composta por anéis de piridina e pirrolidina (Figura 5) (ROSEMBERG, 2002). Trata-se de uma base volátil ( $pK_a = 8,5$ ) incolor, que se torna acastanhada e adquire o odor do tabaco quando exposta ao ar (GOODMAN; GILMAN, 2005).

**Figura 5 - Estrutura química da nicotina.**



É rapidamente absorvida pelas vias respiratórias, membranas bucais e pele, por ser uma base extremamente forte sua absorção no estômago é limitada, sendo absorvida mais eficientemente no intestino. A absorção da nicotina no organismo, é em média 1,0 mg por cigarro, variando de 0,37 mg a 1,56 mg, entretanto a biodisponibilidade pode aumentar em até 3 vezes com a intensidade da tragada e a técnica do fumante (GOODMAN; GILMAN, 2005; BENEWITZ, 1998). Pode ser administrada por via oral na forma de goma, emplastro transdérmico, spray nasal e inalador de vapor, sendo as duas primeiras formas mais amplamente utilizadas, com o objetivo de obter uma concentração plasmática contínua inferior às concentrações sanguíneas venosas após o fumo de cigarros, auxiliando assim, no tratamento contra a síndrome de abstinência (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Cerca de 80-90% da nicotina são alterados no corpo, principalmente no fígado pelo sistema citocromo 450 (CYP), no qual o gene codificador CYP2A6 é ativo nessa metabolização, entretanto pode ser metabolizado também nos rins e nos pulmões. A cotinina é o principal metabólito, enquanto a nicotina-1'-N-óxido e a 3-hidroxicotinina e metabólitos conjugados são encontrados em menores quantidades (ROSEMBERG, 2002; BENEWITZ, 1998). A meia-vida é em torno de 2 horas, porém a da cotinina varia de 18-36 horas, podendo ser útil como marcador de uso da nicotina (FOCCHI, 2003). Tanto a nicotina quanto seus metabólitos são rapidamente eliminados pelos rins. A taxa de excreção urinária depende do pH da urina, na qual a excreção diminui quando a urina é alcalina. Também é excretada no leite de mulheres que fumam durante a lactação, podendo conter 0,5 mg/l (GOODMAN; GILMAN, 2005).

### **1.3.3 Efeitos da nicotina no Sistema Nervoso Central**

As ações sistêmicas da nicotina são mediadas por receptores nicotínicos, de maioria iônica, encontrados no sistema nervoso central (SNC), nos gânglios autonômicos periféricos, na glândula supra-renal, em nervos sensitivos e na musculatura estriada esquelética (MARQUES et al., 2001).

No SNC, a nicotina liga-se a receptores centrais e periféricos, atravessando a barreira hematoencefálica, na qual a partir de múltiplos sítios de ação, produz vários efeitos, preponderantemente excitatórios, ou seja, estimulando a liberação de vários neurotransmissores, como noradrenalina, acetilcolina, dopamina, GABA, entre outros (BRODIE, 1991).

A administração aguda em ratos pode aumentar a liberação de dopamina no sistema límbico e na via nigroestriatal (WISE; HORFFMAN, 1992). A estimulação nicotínica atua também sobre outras áreas cerebrais, como o hipocampo, provocando melhora da atenção e da memória, sobre o córtex pré-frontal, agindo sobre as funções de comportamento social e sobre o sistema noradrenérgico do *locus coeruleus*, na protuberância, relacionado com as respostas ao estresse e implicado na depressão. Este efeito é semelhante ao produzido por outras substâncias como cocaína ou anfetaminas (SENA; FERRET-SENA, 2004; WATKINS; KOOB; MARKOU, 2000). A nicotina também promove um rápido, mas pequeno aumento do estado de alerta (HEISHMAN; TAYLOR; HENNINGFIELD, 1994), e diminui o apetite (SENA; FERRET-SENA, 2004).

Em baixas doses a nicotina afeta o aprendizado, diminui a ansiedade, altera as respostas cardiovasculares, de termorregulação e nocicepção. Em altas doses produz comportamentos mais drásticos, incluindo eventualmente a indução de convulsões tônico-clônicas em roedores (BENOWITZ, 1999; SALAS et al., 2003). Relatos mostram que a nicotina como droga de abuso causa ativação da área tegmental ventral (ATV), uma região mesencefálica envolvida na mediação de ações de recompensa de muitas drogas de abuso, levando à produção de dopamina e à sua liberação, através de neurônios axonais, no núcleo *accumbens* (NAC), zona importante na motivação dos comportamentos devido às suas conexões com o sistema de recompensa e com outras regiões do córtex pré-frontal (BALFOUR, 2004). Estudos com microdiálise mostram que a administração sistêmica ou local de nicotina produz aumentos dose-dependentes nos níveis de dopamina no núcleo *accumbens* (NAC) de animais (SIDHPURA; REDFERN; WONNACOTT, 2007) e no corpo estriado de humanos fumantes (MONTGOMERY et al., 2007).

A administração da nicotina *in vivo* e em culturas celulares desencadeia o aumento da expressão de vários genes relacionados com a neurosecreção incluindo os relacionados à síntese das enzimas biossintetizadoras de catecolaminas, estimulando assim sua liberação (BENOWITZ, 1999).

#### **1.3.4 Nicotina e Convulsão**

A ação convulsiva da nicotina está bem documentada (BENOWITZ, 1999), mas pouco do seu mecanismo foi determinado. Foi demonstrado que estas convulsões

induzíveis são originadas no hipocampo e são centralmente mediadas envolvendo os receptores colinérgicos nicotínicos  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$  e  $\beta 4$  (DAMAJ et al., 1999; KEDMI et al., 2004), pontuando o papel destes receptores na modulação da excitabilidade cerebral, entretanto pouco é conhecido sobre a função destes receptores na gênese das convulsões (LOSCHER et al., 2003).

O envolvimento dos receptores NMDA também foi reportado, mostrando que a liberação de glutamato via estimulação de receptores nicotínicos pré-sinápticos tem sido implicado na ação convulsiva da nicotina, e que um potente antagonista do receptor de glutamato do subtipo NMDA, MK-801 (dizocilpina), mostrou suprimir o desenvolvimento de convulsões induzidas por nicotina (FEDELE et al., 1998; DAMAJ et al., 1999). Há relatos mostrando que o óxido nítrico liberado (NO) pela ativação de receptores NMDA, também apresentem um importante papel nesta excitabilidade (TUTKA et al., 2007).

Apenas recentemente foi determinado que a administração repetida em baixas doses de nicotina está relacionada ao desenvolvimento do abrasamento (BASTLUND et al., 2005), portanto poucas alterações relacionadas ao abrasamento induzido por esta droga têm sido estudadas.

#### **1.4 Diferenças entre as fases de adolescência e idade adulta quanto aos efeitos da nicotina**

O estudo de animais adolescentes e adultos tem como base que grande parte de usuários de drogas de abuso são adolescentes (SAMHSA, 1997), e de fato, a exposição cada vez mais cedo a estas drogas pode ser um forte preditor do uso prolongado e dependência das mesmas (TAOLI; WYDNER, 1991).

Como a adolescência em primatas humanos e não-humanos se estende por vários anos, modelos deste estágio desenvolvimental em roedores, chamada periadolescência, se limita a 2 semanas entre aproximadamente 35 e 50 dias após o nascimento (SPEAR, 2000). Várias características são comuns entre roedores e primatas periadolescentes, exemplos incluem uma grande quantidade de tempo gasto com interações sociais, alto nível de riscos, sensação de procura pelo novo (ADRIANI et al., 2004), hiperatividade e hiperexploração de ambientes novos (CAZA; STEINERT; SPEAR, 1980). Mudanças comportamentais, neuroquímicas e neuroanatômicas que

ocorrem durante este período em ratos são similares às vistas em humanos adolescentes (ADRIANI et al., 2003).

O consumo de tabaco geralmente começa na adolescência. Quanto mais precoce o início, maiores serão a gravidade da dependência e os problemas a ela associados (MARQUES et al., 2001), incluindo uma menor probabilidade de parar de fumar e um maior risco de recidiva (CUI et al., 2006). Apesar da alta prevalência do uso de tabaco entre adolescentes, a neurobiologia da adição por nicotina tem sido estudada principalmente em animais adultos. Pesquisas têm mostrado que fumantes adolescentes apresentam componentes positivos e negativos desta experiência diferente dos fumantes adultos (DIFRANZA, 2007). Embora poucos estudos tenham sido feitos para evidenciar os efeitos da nicotina em modelos animais de adolescência, existem evidências de que animais adolescentes e adultos respondem de maneira diferente à nicotina, como por exemplo, ratos adolescentes quando comparados a adultos foram mais suscetíveis às ações da nicotina na atividade locomotora (CRUZ; DELUCIA; PLANETA, 2005) bem como, exibem uma maior preferência pelo local condicionado (ADRIANI et al., 2006)

### **1.5 Diferenças nos efeitos da nicotina de acordo com o gênero**

O gênero também pode influenciar as respostas comportamentais à exposição aguda e crônica das drogas de abuso (BECKE; HU, 2008). As taxas de abuso de drogas estão mais baixas em mulheres do que em homens, entretanto o número de mulheres usando e abusando de drogas prescritas e ilegais está em ascensão. Os homens estão 2 a 3 vezes mais propensos a ter uma desordem de abuso/dependência, mas esta diferença sexual presente talvez reflita as diferenças na oportunidade, ao invés da vulnerabilidade às drogas (VAN ETTEN; NEUMARK; ANTHONY, 1999).

Pesquisas mostram que adolescentes do sexo feminino parecem apresentar uma particular vulnerabilidade à nicotina (COLLINS; IZENWASSER, 2004; LEVIN et al., 2003), e que estas utilizam mais produtos derivados do tabaco, além de ter uma maior dificuldade em parar o seu uso quando comparadas com os do sexo masculino (PAULY, 2008; PERKINS; SCOTT, 2008). Mulheres também exibem uma maior resposta afetiva negativa durante a retirada da desta droga (BECKE; HU, 2008).

Modelos animais têm mostrado também que roedores machos e fêmeas apresentam diferentes sensibilidades aos efeitos da nicotina. Por exemplo, fêmeas são

menos sensíveis que machos aos estímulos discriminativos da nicotina, coerente com os achados em humanos (DAMAJ, 2001; PERKINS; DONNY; CAGGIULA, 1999), e são mais sensíveis a antinocicepção induzida por esta droga em modelos de dor aguda e crônica (CHIARI et al., 1999). Exibem também um maior aumento da atividade locomotora após a administração intravenosa crônica de nicotina (BOOZE et al., 1999). Quanto às crises convulsivas induzidas pela mesma, observou-se que estas crises são mais severas em fêmeas (TESKEY; HUTCHINSON; KOLB, 1999).

Sugere-se que estas diferenças sexuais são suportadas pela influência dos hormônios gonadais, no qual os níveis destes hormônios mudam através do ciclo menstrual (humanos) ou estral (roedores). Estudos em humanos que mostram os efeitos da fase do ciclo menstrual sobre o consumo de cigarros e sobre as ações psicoativas da nicotina são conflitantes, entretanto a maioria relata que a fase do ciclo menstrual pode influenciar os sintomas auto-relatados de abstinência em mulheres (BENOWITZ; HATSUKAMI, 1998). Pesquisas em animais sugerem que os hormônios ovarianos podem influenciar nos efeitos agudos da nicotina, como por exemplo, a administração exógena de estrógeno em fêmeas tem um efeito pró-convulsivante, ou seja, acelera o tempo para o início da convulsão (TESKEY; HUTCHINSON; KOLB, 1999).

## **1.6 Nicotina e estresse oxidativo**

Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas foram realizadas com o objetivo de se esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação e doenças neuropsiquiátricas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FATTAL et al., 2006). O cérebro está entre os órgãos mais vulneráveis devido ao seu elevado consumo de oxigênio e por que os seus lipídios de membrana celular são altamente oxidáveis (GUPTA, 2004).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ERO ou ERN (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

ERO é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio como radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) e radical superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ),

mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ )<sup>2</sup> (Figura 6) (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006). Sua formação ocorre por reações relacionadas à produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, o excesso de radicais livres apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão as proteínas dos tecidos e membranas, enzimas, carboidratos e ao DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

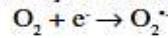
Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, com perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (malondilaldeído), culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Embora as EROs possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra a infecção, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir o microorganismo. Contudo, poderão ocorrer vários eventos nosológicos, se houver estímulos exagerado na produção dessas espécies (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

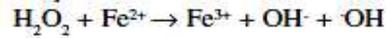
## Figura 6 - Exemplos de formação enzimática de ERO

### Geração de ROS

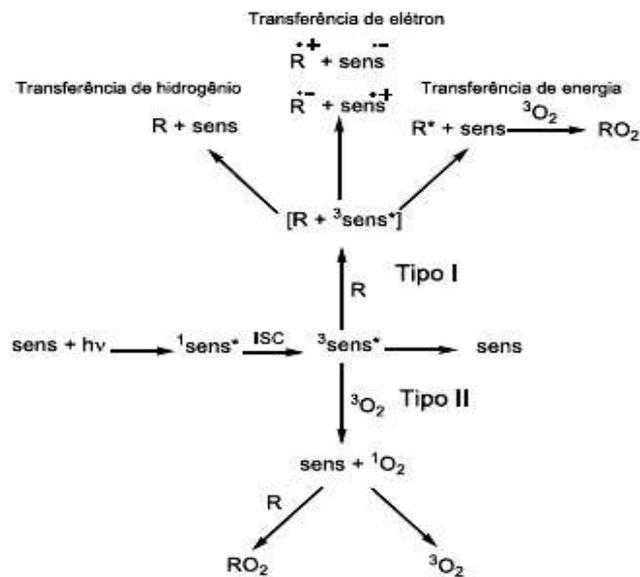
Formação de radical superóxido



Formação de radical hidroxila - Reação de Fenton



\*Formação de oxigênio singlete por fotossensibilização Tipo II



Fonte: Modificado por Berra, Menck e Di Mascio (2006).

Evolutivamente, foram selecionadas várias estratégias antioxidantes para as células lidarem com a toxicidade do oxigênio. Compreendem: enzimas que removem cataliticamente radicais e espécies reativas, como por ex., as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase, glutatona peroxidase e catalases (Figura 7); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, tais como íons ferro e cobre, como por ex., as transferrinas, ferritinas, metalotioneinas e haptoglobinas; proteínas que protegem processos celulares contra danos oxidativos através de outros mecanismos não-enzimáticos, como por ex., as proteínas de estresse (“stress proteins”); moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar ERO via auto-oxidação, como por ex., glutatona e aquelas que possuem grupo tiol (SH), ou vitaminas como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e  $\beta$ -caroteno (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

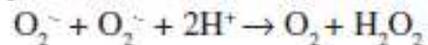
Entretanto, de todas elas, três sistemas são fundamentais: 1º - Composto por dois tipos de enzimas SOD, a primeira contém  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  como centros redox, ocorre no citosol e sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo, e a segunda contém  $\text{Mn}^{2+}$  como centro redox, ocorre no citosol e sua atividade aumenta com o estresse. Catalisam a destruição do ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A ação desta enzima permite a eliminação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  mesmo em baixas concentrações; 2º - Formado pela enzima catalase, é um sistema de prevenção muito mais simples, que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em oxigênio e água; 3º - Composto pelo GSH em conjunto com duas enzimas GPx e GR. Também catalisa a dismutação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio, sendo que a glutathione opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Assim, em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre os agentes óxido-redutores (EROs) e o sistema antioxidante.

**Figura 7 - Esquema de desativação enzimática das ERO.**

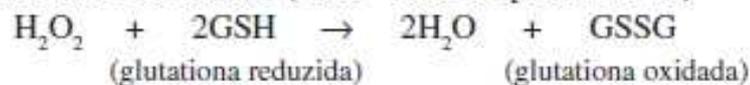
---

**Proteção contra ROS**

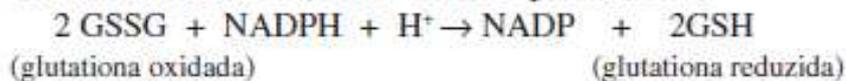
Superóxido Dismutase (SOD – citoplasma, mitocôndria)



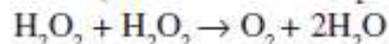
Glutathione Peroxidase (GPx – fora do peroxissoma)



Glutathione Redutase (GRd – fora do peroxissoma)



Catalase (CAT – dentro do peroxissoma)



**Fonte:** Modificado por Berra, Menck e Di Mascio (2006).

Já foi demonstrado que a nicotina é capaz de induzir o estresse oxidativo, ambos *in vivo* e *in vitro* (SULEYMAN et al., 2002), entretanto o mecanismo de geração destes radicais ainda não está claro. Em um estudo observou-se que a nicotina interrompe a cadeia respiratória mitocondrial, que é a principal fonte fisiológica de ERO

e tem um papel importante em processos de apoptose e proliferação, levando ao aumento da formação do íon superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e peróxido de hidrogênio (YILDIZ et al., 1999). Em outro, foi provado a sua atividade antiapoptótica, por modular as vias de sinalização mitocondrial e inibir a apoptose induzida por um quimioterápico em câncer de pulmão (ZHANG et al., 2008). Mais que isso, o tratamento com nicotina, agudo ou crônico, também pode regular a atividade da mitocôndria no cérebro, levando ao aumento na expressão de malato desidrogenase e succinato desidrogenase do ciclo de Krebs mitocondrial em córtex frontoparietal de ratos, mas não em outras regiões cerebrais (TUREGANO et al., 2001). Há também evidências que o tratamento crônico aumenta a quantidade de glutathione S-transferase mitocondrial, o maior componente antioxidante celular, em cérebros de ratos (BHAGWAT et al., 1998).

### **1.7 Relevância e Justificativa**

Apesar da alta prevalência do uso de tabaco entre adolescentes, a neurobiologia da adição por nicotina tem sido estudada principalmente em animais adultos. Embora poucos estudos tenham sido feitos para evidenciar os efeitos da nicotina em modelos animais de adolescência, existem evidências de que animais adolescentes e adultos respondem de maneira diferente à nicotina.

Baseado no fato de que após a caracterização do abasamento induzido por nicotina feito por Bastlund et al. (2005), nenhum outro trabalho foi realizado na tentativa de aprofundar esta temática, associado ao fato de que o entendimento dos mecanismos do abasamento são muito importantes na psiquiatria, pois mostram como pequenos estímulos são capazes de gerar um comportamento patológico, foi que resolvemos estudar o presente assunto.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Investigar a influência do gênero e da idade em alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo abasamento por nicotina em ratos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Observar em ratos machos e fêmeas, adolescentes e adultos as diferenças comportamentais na susceptibilidade ao desenvolvimento do abasamento induzido por nicotina;
- Determinar o envolvimento do estresse oxidativo no abasamento por nicotina em diferentes áreas cerebrais de ratos machos e fêmeas, adolescentes e adultos através da determinação de defesas antioxidantes como:
  - Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD);
  - Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH);
- Verificar as alterações nos níveis de TBARS como medida da peroxidação lipídica em animais após o desenvolvimento do abasamento por nicotina;
- Analisar os níveis de nitrito/nitrato em animais submetidos ao abasamento por nicotina.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas 35-37 dias (periadolescentes) e 73-75 dias (adultos) após o nascimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), ambientados em grupos de 6 animais em caixas de propileno  $26 \pm 2$  °C, a um ciclo claro/escuro de 12 h, recebendo ração padrão e água “ad libitum”. O peso dos animais foi monitorado diariamente, 60 minutos antes da administração das drogas para verificar sua saúde e responsividade à droga. A presente pesquisa foi iniciada após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, com protocolo nº 20/2011 e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (OLFERT et al., 1993).

#### 3.2 Droga utilizada

A solução de nicotina foi obtida sob a forma de base livre, (-)-*Nicotine hemisulfate salt*, proveniente do Sigma. Inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta para a determinação da dose capaz de induzir o abasamento, nas seguintes concentrações: 1,0; 1,5; 2,0 e 2,3 mg/kg (dados não mostrados). Posteriormente, a dose utilizada foi de 2,0 mg/kg (dose subconvulsivante). As soluções foram preparadas diariamente e administrada por via intraperitoneal (0,1ml/ 100 g de peso corporal).

#### 3.3 Estratégia experimental

As metodologias descritas neste projeto visaram investigar a influência do gênero e idade nas alterações comportamentais e neuroquímicas através da indução do abasamento por nicotina em animais machos e fêmeas, periadolescentes e adultos. A primeira metodologia empregada foi verificar as diferenças quanto ao desenvolvimento do abasamento em ratos machos e fêmeas, periadolescentes e adultos, bem como do período de tempo que este leva para ocorrer. Posteriormente, os grupos foram tratados

com o objetivo de se verificar o envolvimento e alterações nos parâmetros de estresse oxidativo que ocorram durante este processo.

### **3.4 Tratamento dos animais e esquema de indução do abrasamento**

O abrasamento foi induzido de acordo com método previamente descrito (BASTLUND et al., 2005). Os animais receberam repetidas injeções de nicotina na dose de 2,0 mg/kg, i.p., administradas todos os dias da semana (segunda-feira à sexta-feira) durante 4 semanas, entretanto na 4ª semana a última aplicação ocorreu na quinta-feira. A quantificação das convulsões foi feita por observação visual por um período de 15 minutos após a administração da droga. O tempo de observação limitou-se há 15 minutos, visto que estudos prévios mostraram que para a dose de nicotina utilizada este tempo é suficiente (BASTLUND et al., 2005). Os animais controle receberam solução salina pelo mesmo intervalo de tempo (4 semanas). A administração da droga foi feita no mesmo período e local.

Para determinação da atividade convulsivante, os animais foram avaliados pela escala de Racine (1972), modificada por Itzhak e Martin (2000), nos quais os estágios são classificados da seguinte forma: estágio 1 – comportamento normal; estágio 2 – hiperatividade; estágio 3 – movimentos verticais repetidos que podem representar comportamento estereotipado; estágio 4 – clonias das patas dianteiras e “rearing” e estágio 5 – ataques motores completos. O abrasamento completo foi considerado quando o rato apresentou manifestações correspondentes ao estágio 5, caracterizado por clonias de membros anteriores e posteriores, flexão da cabeça e corpo inteiro e perda completa do controle postural.

### **3.5 Determinação do estresse oxidativo em animais induzidos ao abrasamento por nicotina**

Para a realização dos experimentos abaixo, ratos machos e fêmeas periadolescentes e adultos foram tratados com nicotina e após a indução do abrasamento, ou seja, no 25º dia, os mesmos animais foram eutanasiados por decapitação, as áreas cerebrais removidas – córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e

corpo estriado (CE) – e colocadas rapidamente em gelo. CPF, HC e CE foram homogeneizadas a 10%, em tampão de fosfato de potássio 5 mM pH7,4. Por fim, os homogenatos foram usados para avaliar a atividade da SOD e quantificação dos níveis de GSH, níveis de nitrito como forma indireta de determinar os níveis de óxido nítrico sintetizados, e por fim, níveis de MDA.

### **3.5.1 Determinação da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) em animais induzidos ao abrasamento por nicotina**

A atividade da SOD foi mensurada de acordo com Sun, Oberley e Li (1988). A quantidade da enzima foi avaliada medindo-se a sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazólio (NBT). Neste método a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera  $O^{2-}$  o qual reduz o NBT produzindo formazan que absorve no comprimento de onda de 560nm. Na presença da SOD a redução do NBT é inibida. Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína, que é a quantidade da SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%. O homogenato (10% em tampão fosfato) foi centrifugado (10 minutos, 3600 rpm a 4°C). O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente (20 min, 12000 rpm, 4°C). Para o ensaio utilizou-se o sobrenadante. Em uma câmara escura foram misturados 1mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8), 30  $\mu$ L da amostra, 150 $\mu$ L do NBT 75 $\mu$ M e 300  $\mu$ L riboflavina 2 $\mu$ M. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 minutos. Ao término do tempo, levou-se o material ao espectrofotômetro com absorvância de 560nm. A dosagem da concentração de proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford (1976).

### **3.5.2 Quantificação dos níveis da Glutathiona Reduzida (GSH) em animais induzidos ao abrasamento por nicotina**

Foram retirados 65,57 $\mu$ L dos homogenatos e adicionados a 52,45 $\mu$ L de água destilada e 13,11 $\mu$ L de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida foi recolhido 65,57 $\mu$ L do sobrenadante e acrescidos 131,14 $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,4M pH 8,9 e 3,27 $\mu$ L de DTNB 0,01M, após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412nm

através de leitor de placas. A concentração de glutathiona reduzida é expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva-padrão.

### **3.5.3 Dosagem de nitrito/nitrato em animais induzidos ao abasamento por nicotina**

O método foi baseado na utilização do reagente de Griess que mostra a presença de nitrito na amostra por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea. O reagente foi preparado utilizando partes iguais de ácido fosfórico 5%, N-1-naftilenodiamina (NEED) 0,1%, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e água destilada. Para realização do ensaio foi adicionado 100 µL do sobrenadante do homogenato a 10%, feito com tampão de fosfato de potássio, em 100 µL do reagente de Griess, para o branco foi adicionado 100 µL do reagente em 100 µL de tampão e para a obtenção da curva-padrão foi preparada uma solução de NaNO<sub>2</sub> estoque (10 mM em tampão) e a partir destas foram feitas diluições em série (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µM) de nitrito. Todo o ensaio foi feito em uma placa de 96 poços e a leitura feita na faixa de absorvância de 560 nm (GREEN; TANNENBAUN; GOLDMAN, 2000).

### **3.5.4 Avaliação da peroxidação lipídica em animais induzidos ao abasamento por nicotina**

O grau de lipoperoxidação nos tecidos foi medido através da determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método descrito por Huang et al. (1998), seguindo o protocolo: As amostras foram homogenizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorvância a 535 nm e foi expressa como mmol tecido MDA / g. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Bradford (1976).

Para a obtenção da curva-padrão de malondialdeído (MDA), a partir da solução padrão de MDA, foram preparadas diluições em série (16,77; 9,16; 4,8; 2,463; 1,247 e 0,627 µmol). O branco foi feito com água destilada. A leitura da absorvância foi

realizada a 520 e 535 nm, o valor utilizado foi a subtração da leitura em 535 da leitura em 520, para determinação da equação da curva-padrão de MDA.

### **3.6 Análise estatística**

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA. Copyright (c) 1992 – 2007. Os resultados comportamentais foram analisados por two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Os resultados dos experimentos de estresse oxidativo foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) analisados através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. Valores significativos para ambas as análises foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

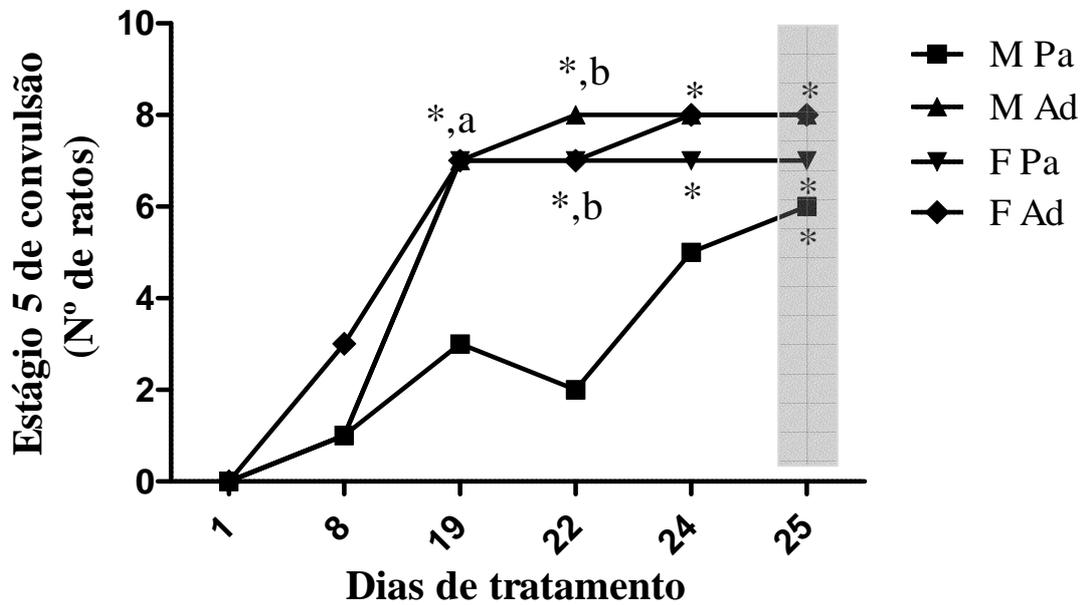
### 4.1 Avaliação do desenvolvimento do abramamento induzido por nicotina em ratos

A administração diária (segunda-feira à sexta-feira) de NIC na dose de 2,0 mg/kg em ratos machos periadolescentes (n=8), fêmeas periadolescentes (n=8), machos adultos (n=8) e fêmeas adultos (n=8), foi capaz de induzir o abramamento ao longo do tempo. No primeiro dia de administração, nenhum animal convulsionou. No 25º dia de administração todos os animais machos e fêmeas adultos apresentaram estágio 5 de convulsão (de acordo com a escala de Racine, ver metodologia). Os machos periadolescentes se mostraram mais resistentes ao desenvolvimento do abramamento, quando comparados às fêmeas periadolescentes visto que apenas 75 % (n=6) dos animais deste grupo apresentaram convulsão estágio 5, enquanto no grupo de fêmeas periadolescentes 87,5 % (n=7) atingiram este estágio.

Machos e fêmeas adultos e periadolescentes apresentaram estágio 5 mais precocemente, ou seja, com 19 dias ( $p < 0,05$  quando comparado aos machos periadolescentes) após o início do tratamento, enquanto que os machos periadolescentes apresentaram estágio 5 apenas no 25º dia de tratamento (Figura 8).

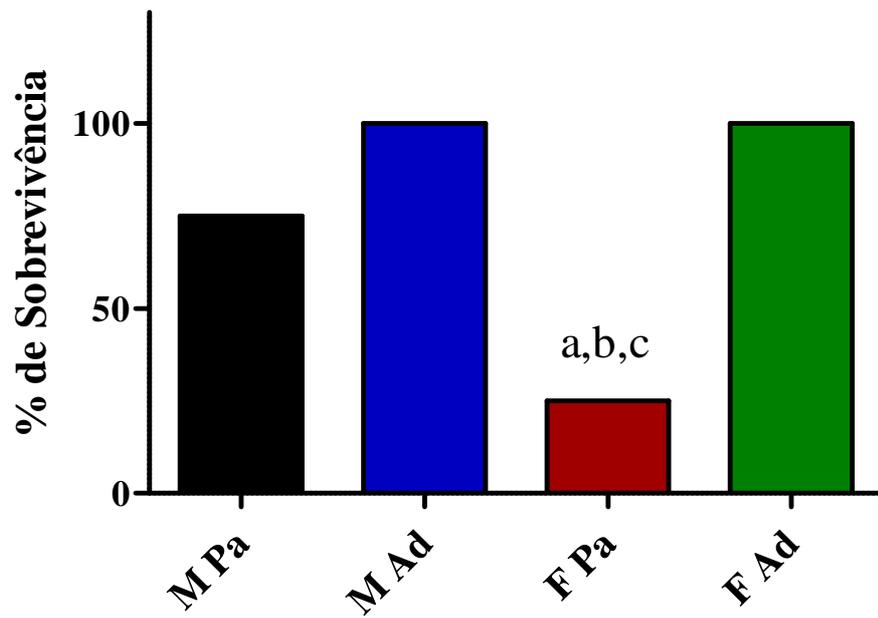
As fêmeas periadolescentes foram mais susceptíveis à morte com o tratamento com NIC na dose 2,0 mg/kg, pois houve apenas 25% de sobrevivência neste grupo ao longo do tempo (Figura 9) quando comparada com os demais grupos. Os animais adultos (machos e fêmeas) foram mais resistentes aos efeitos da NIC, pois desenvolveram o abramamento sem resultar em morte.

**Figura 8 - Desenvolvimento do abramamento induzido por nicotina em ratos machos e fêmeas, periadolescentes e adultos, de acordo com o estágio 5 da escala de convulsão de Racine (1972).**



Cada linha representa o número de animais que apresentaram o estágio 5 de convulsão em relação ao tempo de tratamento. Os animais receberam nicotina na dose 2,0 mg/kg, via intraperitoneal, por 25 dias durante a semana de segunda a sexta-feira. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao primeiro dia de tratamento (dia 1). <sup>a, b</sup>  $p < 0,05$  no 19º dia e 22º dia em relação ao macho periadolescente, respectivamente. Abreviações: M Pa – machos periadolescentes, F Pa – fêmeas periadolescentes, M Ad – machos adultos, F Ad – fêmeas adultas.

**Figura 9 - Percentual de sobrevivência dos animais submetidos ao abramamento induzido por nicotina.**



Cada barra representa o número de animais que sobreviveram após 25 dias de administração de nicotina. Os animais receberam nicotina (2,0 mg/kg, via intraperitoneal) por 25 dias durante a semana de segunda a sexta-feira. <sup>a, b, c</sup>  $p < 0,05$  quando comparado aos animais machos periadolescentes, machos e fêmeas adultos, respectivamente. Abreviações: M Pa – machos periadolescentes, F Pa – fêmeas periadolescentes, M Ad – machos adultos, F Ad – fêmeas adultas.

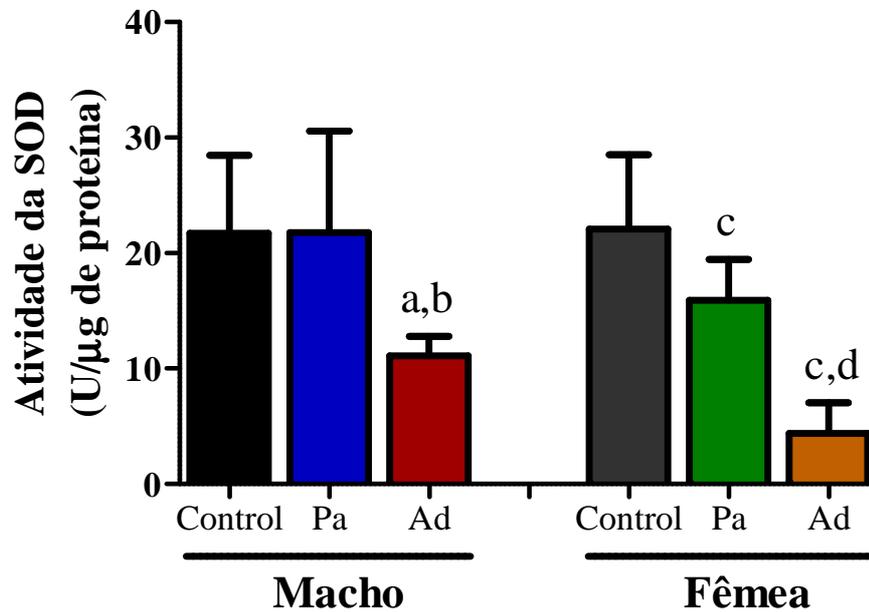
## 4.2 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Após a indução do abrasamento por NIC, os animais foram eutanasiados por decapitação e dissecados com o objetivo de determinar a atividade da enzima SOD. Observou-se que os machos adultos, fêmeas periadolescentes e adultas submetidos ao abrasamento apresentaram uma diminuição significativa da atividade enzimática da SOD no córtex pré-frontal (CPF) em relação aos animais controles dos seus respectivos gêneros (Controle macho:  $21,71 \pm 3,04$ ; Macho adulto:  $11,1 \pm 0,69$ ; Controle fêmea:  $22,09 \pm 2,87$ ; Fêmea periadolescente:  $15,92 \pm 1,44$ ; Fêmea adulto:  $4,39 \pm 1,18$ ), bem como esta diminuição encontrada em machos e fêmeas adultos também foi estatisticamente significativa em relação aos animais periadolescentes (Macho adulto:  $11,1 \pm 0,69$ ; Macho periadolescente:  $21,79 \pm 3,59$ ; Fêmea adulto:  $4,39 \pm 1,18$ ; Fêmea periadolescente:  $15,92 \pm 1,44$ ). Os machos periadolescentes (Macho periadolescente:  $21,79 \pm 3,59$ ; Controle macho:  $21,71 \pm 3,04$ ) permaneceram com os níveis enzimáticos de SOD similares aos do grupo controle (Figura 10).

No corpo estriado (CE), ocorreu um evento similar ao encontrado no CPF, ou seja, machos adultos, fêmeas periadolescentes e adultas também apresentaram uma diminuição da atividade enzimática da SOD (Controle macho:  $25,41 \pm 1,53$ ; Macho adulto:  $10,46 \pm 0,64$ ; Controle fêmea:  $27,31 \pm 2,02$ ; Fêmea periadolescente:  $8,83 \pm 0,36$ ; Fêmea adulto:  $10,27 \pm 0,86$ ), contudo apenas os machos adultos apresentaram a atividade da SOD diminuída comparados aos periadolescentes (Macho adulto:  $10,46 \pm 0,64$ ; Macho periadolescente:  $26,07 \pm 2,11$ ) (Figura 11). Os machos periadolescentes permaneceram com a atividade da SOD similar aos animais do grupo controle (Macho periadolescente:  $26,07 \pm 2,11$ ; Controle macho:  $25,41 \pm 1,53$ ).

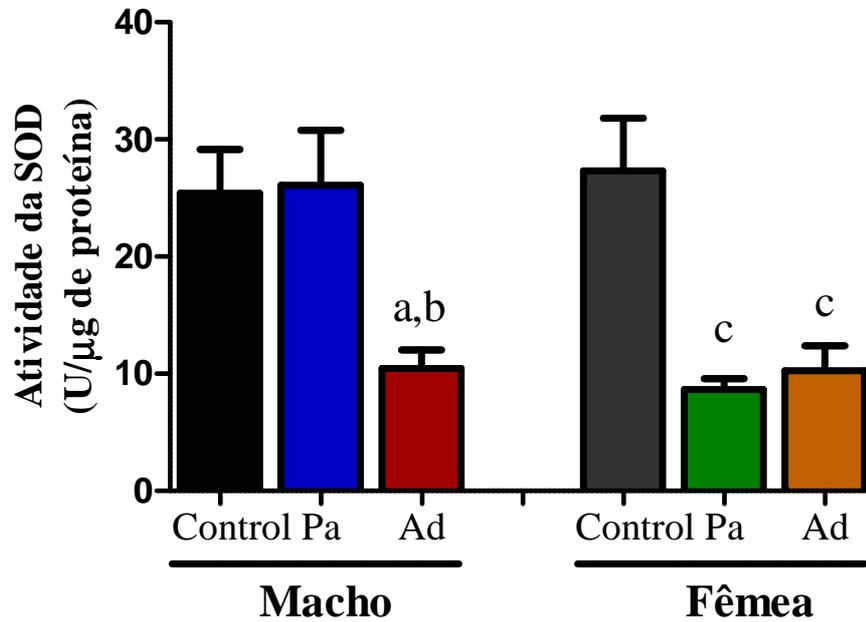
Não houve diferenças entre os grupos na atividade da SOD no hipocampo (HC) (Controle macho:  $19,68 \pm 1,24$ ; M Pa:  $19,74 \pm 0,83$ ; M Ad:  $16,84 \pm 0,61$ ; Controle fêmea:  $20,43 \pm 1,43$ ; F Pa:  $17,51 \pm 1,27$ ; F Ad:  $17,75 \pm 0,86$ ), como mostrado na Figura 12.

**Figura 10 - Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no córtex pré-frontal de animais submetidos ao abramamento por nicotina.**



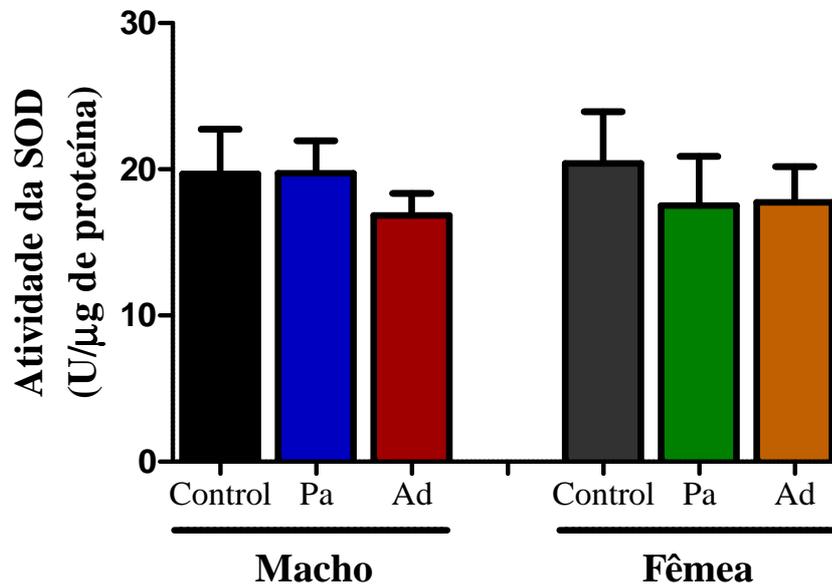
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. <sup>a,b,c,d</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle (macho), macho periadolescente, controle (fêmea) e fêmea periadolescente, respectivamente. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto

Figura 11 - Atividade da enzima Superóxido Dismutase no corpo estriado de animais submetidos ao abrasamento por nicotina.



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. <sup>a,b,c</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle (macho), macho periadolescente e controle (fêmea), respectivamente. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

Figura 12 - Atividade da enzima Superóxido Dismutase no hipocampo de animais submetidos ao abasamento por nicotina.



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

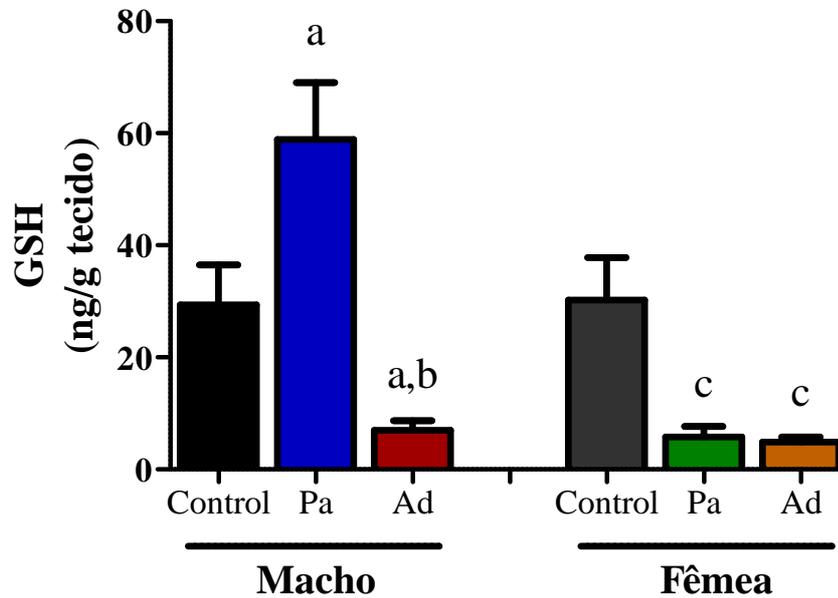
### **Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)**

No CPF observou-se que o conteúdo de GSH diminuiu significativamente em animais machos adultos induzidos ao abasamento por nicotina quando comparados aos grupos macho controle e periadolescente (M Ad:  $6,93 \pm 0,61$ ; Controle macho:  $29,39 \pm 2,89$ ; M Pa:  $58,92 \pm 4,51$ ). A mesma diminuição ocorreu nas fêmeas periadolescentes e adultas em relação ao grupo controle (F Pa:  $5,76 \pm 0,69$ ; F Ad:  $4,87 \pm 0,39$ ; Controle fêmea:  $30,24 \pm 3,39$ ). Em contraste, os machos periadolescentes um aumento nos níveis de GSH em relação ao grupo controle (M Pa:  $58,92 \pm 4,51$ ; Controle macho:  $29,39 \pm 2,89$ ) (Figura 13).

No CE, os níveis de GSH diminuíram nos machos adultos quando comparados ao seu respectivo controle e animais periadolescentes (M Ad:  $5,36 \pm 0,80$ ; Controle macho:  $23,44 \pm 3,50$ ; M Pa:  $37,10 \pm 7,14$ ); os machos periadolescentes apresentaram um aumento significativo do conteúdo de GSH em relação ao controle (M Pa:  $37,10 \pm 7,14$ ; Controle macho:  $23,44 \pm 3,50$ ). Enquanto as fêmeas periadolescentes e adultas mostraram uma diminuição em relação aos animais controle (F Pa:  $4,64 \pm 0,47$ ; F Ad:  $10,92 \pm 0,48$ ; Controle fêmea:  $25,41 \pm 3,43$ ), similarmente ao ocorrido no CPF. Entretanto, nas fêmeas adultas, apesar dos níveis de GSH estarem diminuídos em relação aos grupos supracitados, estas apresentaram um aumento significativo deste conteúdo em relação às fêmeas periadolescentes (F Ad:  $10,92 \pm 0,48$ ; F Pa:  $4,64 \pm 0,47$ ) (Figura 14).

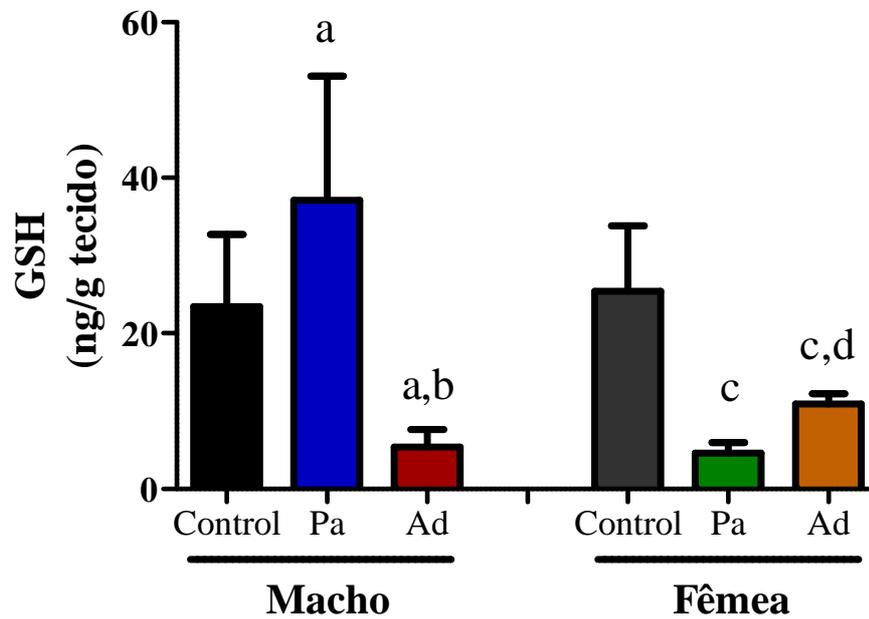
Em relação ao HC, houve também uma diminuição dos níveis de GSH em ratos machos adultos quando comparados com os grupos machos controle e periadolescente (M Ad:  $7,79 \pm 0,44$ ; M Pa:  $50,51 \pm 2,43$ ; Controle macho:  $44,38 \pm 5,9$ ). Fêmeas periadolescentes e adultas mostraram o conteúdo de GSH reduzidos em comparação ao grupo controle (F Ad:  $7,57 \pm 0,62$ ; F Pa:  $7,36 \pm 0,72$ ; Controle fêmea:  $44,68 \pm 5,76$ ) (Figura 15).

**Figura 13 - Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) em córtex pré-frontal de animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina.**



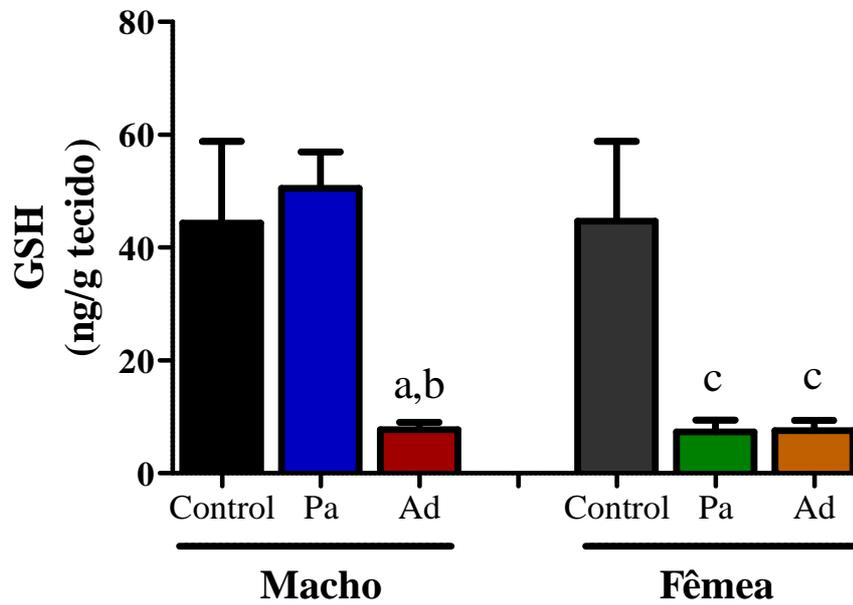
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. <sup>a,b,c</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle (macho), macho periadolescente e controle (fêmea), respectivamente. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

**Figura 14 - Níveis de Glutationa Reduzida (GSH) em corpo estriado de animais submetidos ao abramamento induzido por nicotina.**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. <sup>a,b,c,d</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle (macho), macho periadolescente, controle (fêmea) e fêmea periadolescente, respectivamente. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

**Figura 15 - Níveis de Glutaciona Reduzida (GSH) em hipocampo de animais submetidos ao abراسamento induzido por nicotina.**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. <sup>a,b,c</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle (macho), macho periadolescente e controle (fêmea), respectivamente. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

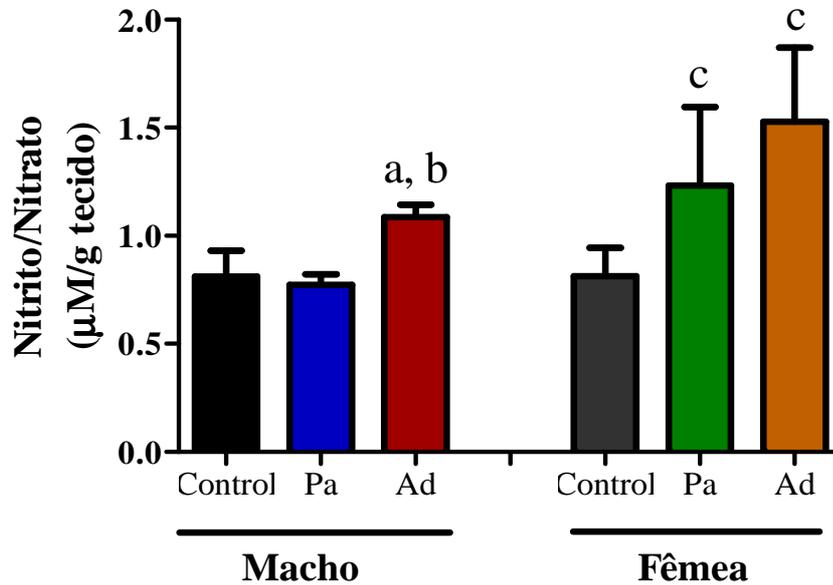
### 4.3 Determinação dos níveis de Nitrito/Nitrato

A participação do óxido nítrico no abrasamento induzido por nicotina foi avaliada pela determinação do conteúdo de nitrito/nitrato. O conteúdo de nitrito/nitrato apresentou uma elevação no CPF no grupo macho adulto em comparação aos machos periadolescente e controle (M Ad:  $1,08 \pm 0,02$ ; M Pa:  $0,77 \pm 0,01$ ; Controle macho:  $0,81 \pm 0,04$ ), bem como nas fêmeas periadolescente e adulta em relação ao grupo controle (F Pa:  $1,23 \pm 0,13$ ; F Ad:  $1,52 \pm 0,12$ ; Controle fêmea:  $0,81 \pm 0,05$ ) (Figura 16).

No CE não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em estudo (Controle macho:  $0,98 \pm 0,07$ ; M Pa:  $0,88 \pm 0,07$ ; M Ad:  $1,13 \pm 0,05$ ; Controle fêmea:  $1,07 \pm 0,06$ ; F Pa:  $0,94 \pm 0,04$ ; F Ad:  $1,11 \pm 0,11$ ) (Figura 17).

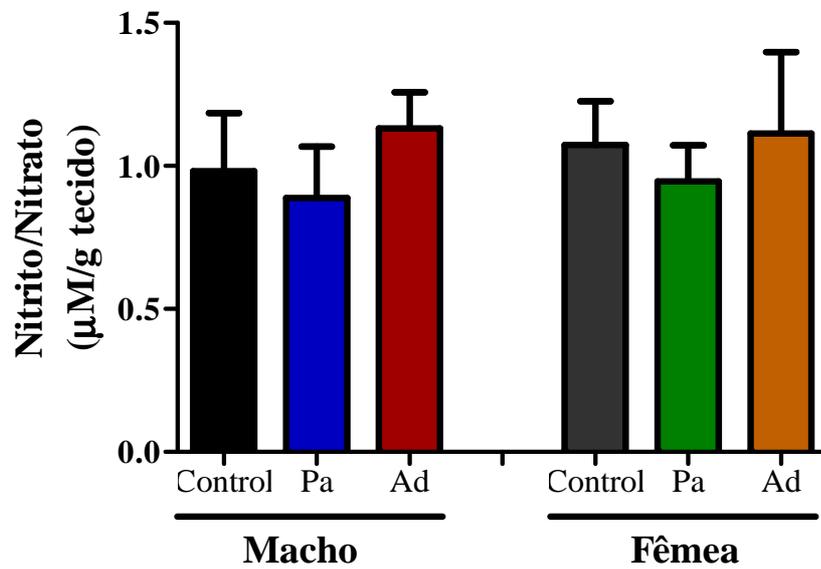
Quanto ao HC, foi observado uma diminuição dos níveis de nitrito/nitrato nas fêmeas periadolescentes e adultas em relação ao grupo controle (F Pa:  $0,89 \pm 0,03$ ; F Ad:  $1,03 \pm 0,03$ ; Controle fêmea:  $1,2 \pm 0,05$ ). Entre os ratos machos não houve diferenças significantes (Controle macho:  $1,38 \pm 0,17$ ; M Pa:  $1,16 \pm 0,16$ ; M Ad:  $0,99 \pm 0,06$ ) (Figura 18).

Figura 16 - Níveis de Nitrito em córtex pré-frontal de animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina.



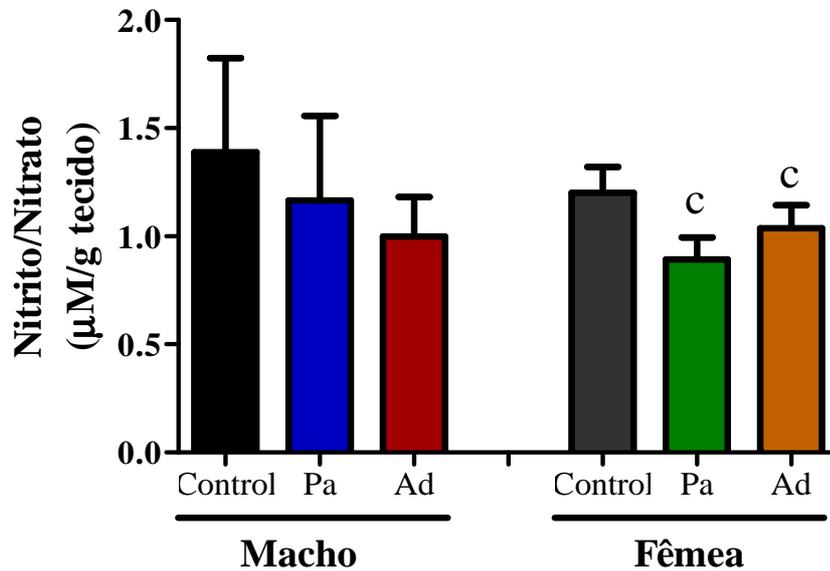
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. <sup>a, b, c</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle (macho), macho periadolescente e controle (fêmea), respectivamente. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

Figura 17 - Níveis de Nitrito em corpo estriado de animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina.



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

Figura 18 - Níveis de Nitrito em hipocampo de animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina.



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. <sup>c</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle (fêmea). Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

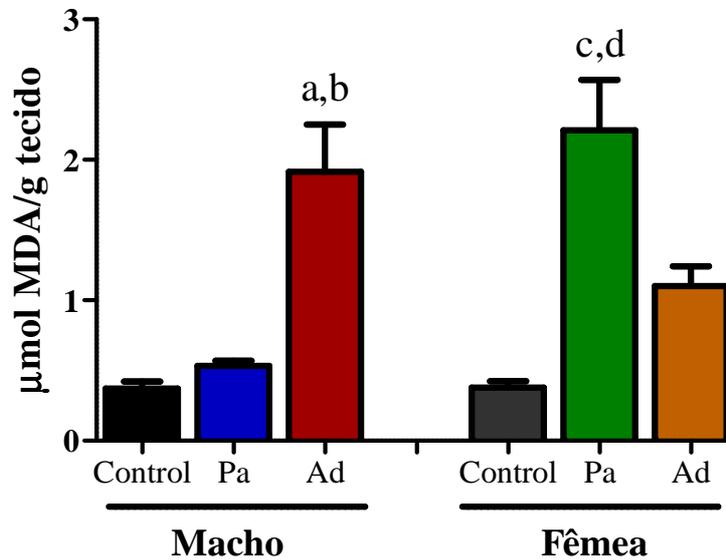
#### 4.4 Determinação dos níveis de Peroxidação Lipídica das membranas

Para determinar as alterações na peroxidação lipídica em animais submetidos ao abasamento, os níveis de MDA, um importante marcador do estresse oxidativo foi determinado. Os níveis de MDA mostraram-se significativamente aumentados no CPF de animais machos adultos em comparação aos ratos machos controle e periadolescente (M Ad:  $1,91 \pm 0,33$ ; Controle macho:  $0,37 \pm 0,04$ ; M Pa:  $0,53 \pm 0,03$ ). Foi observada também uma elevação destes níveis em animais fêmeas periadolescentes em relação aos grupos controle e adulto (F Pa:  $2,21 \pm 0,35$ ; Controle fêmea:  $0,37 \pm 0,04$ ; F Ad:  $1,1 \pm 0,14$ ). Os machos periadolescentes não apresentaram alterações nos níveis de MDA quando comparado ao controle (M Pa:  $0,53 \pm 0,03$ ; Controle macho:  $0,37 \pm 0,04$ ) (Figura 19).

Nenhuma alteração nos níveis de MDA foi detectada no CE dos animais em estudo (Controle macho:  $1,33 \pm 0,15$ ; M Pa:  $1,32 \pm 0,31$ ; M Ad:  $1,07 \pm 0,9$ ; Controle fêmea:  $1,35 \pm 0,17$ ; F Pa:  $1,05 \pm 0,08$ ; F Ad:  $1,09 \pm 0,1$ ) (Figura 20).

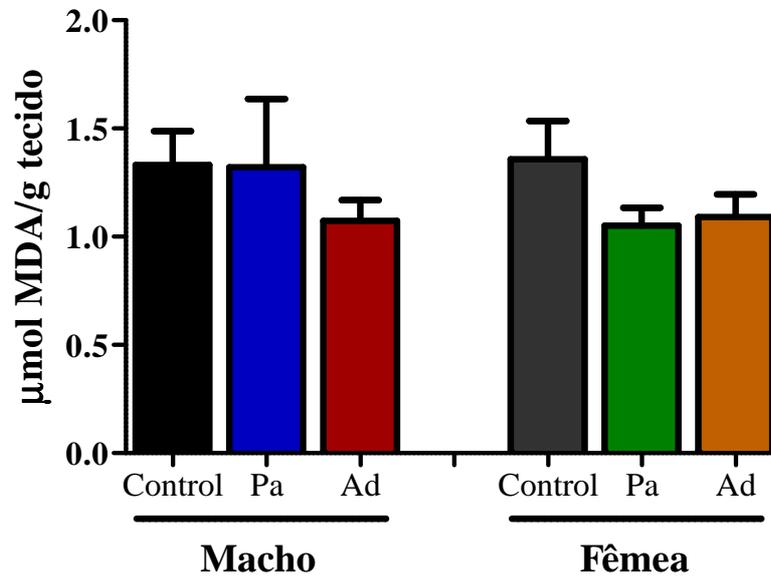
No HC, o conteúdo de MDA apresentou-se elevado em machos adultos quando comparados aos grupos machos controle e periadolescente (M Ad:  $1,99 \pm 0,35$ ; Controle macho:  $0,86 \pm 0,22$ ; M Pa:  $0,53 \pm 0,13$ ), e nas fêmeas periadolescentes também houve um aumento destes níveis comparados aos animais fêmeas controle e adultos (F Pa:  $1,31 \pm 0,11$ ; Controle fêmea:  $0,68 \pm 0,17$ ; F Ad:  $0,88 \pm 0,06$ ). Os machos periadolescentes não apresentaram alterações nos níveis de MDA quando comparado ao controle (M Pa:  $0,53 \pm 0,13$ ; Controle macho:  $0,37 \pm 0,04$ ) (Figura 21).

**Figura 19 - Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) em córtex pré-frontal de animais submetidos ao abراسamento induzido por nicotina.**



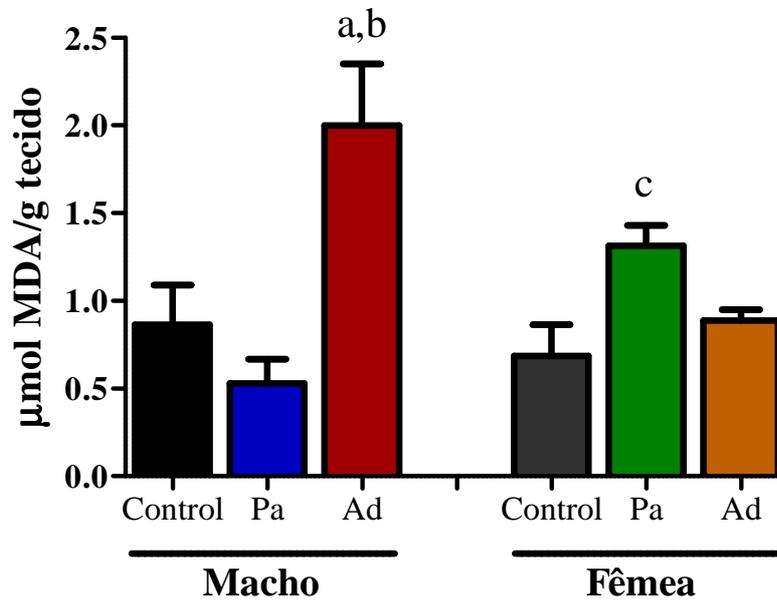
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. <sup>a, b,c,d</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle (macho), macho periadolescente, controle (fêmea) e fêmea adulta, respectivamente. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

**Figura 20 - Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) em corpo estriado de animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina.**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. Abreviações: Control – controle, Pa – peradolescente, Ad – adulto.

**Figura 21 - Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) em hipocampo de animais submetidos ao abramamento induzido por nicotina.**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student's-Newman-Keuls como teste *post-hoc* para comparações múltiplas. <sup>a, b, c</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle (macho), macho periadolescente, controle (fêmea) e fêmea periadolescente, respectivamente. Abreviações: Control – controle, Pa – periadolescente, Ad – adulto.

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado que o gênero e idade são capazes de influenciar a susceptibilidade ao abrasamento por nicotina. Os resultados mostraram que as fêmeas periadolescentes foram mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da nicotina, pois este grupo de animais apresentou um elevado número de mortes em relação aos demais grupos estudados. As fêmeas periadolescentes juntamente com os ratos machos e fêmeas adultos desenvolveram estágio 5 de convulsão, de acordo com a escala de Racine (1972), no 19º dia de administração mostrando uma alta vulnerabilidade destes grupos de animais ao abrasamento, ao contrário dos machos periadolescentes que foram mais resistentes, apresentado o estágio 5 apenas no 25º dia de administração da nicotina, associado a um pequeno número de mortes.

A nicotina é o maior componente neuroativo e aditivo do tabaco. Atua em vias neuronais relacionadas ao comportamento, modulando ansiedade, inibição comportamental e recompensa (ABREU-VILLAÇA et al., 2003). Seus efeitos são variáveis dependendo da dose utilizada; do subtipo e densidade de diferentes receptores de nicotina existentes em distintas regiões cerebrais; dos processos de dessensibilização e tolerância de receptores nicotínicos e de outros fatores neuronais (DAMAJ et al., 1999).

O fenômeno estudado neste trabalho, a sensibilização ou abrasamento (*kindling*) tem recebido uma grande atenção nos esforços para entender a fisiopatologia e história natural dos transtornos psiquiátricos, como, episódios de mania e transtornos do humor. Modelos fisiopatológicos de transtornos psiquiátricos aparentemente tão diversos como transtornos do humor (GHAEMI; BOIMAN; GOODWIN, 1999), esquizofrenia (DUNCAN; SHEITMAN; LIEBERMAN, 1999), dependência de drogas (BECKER, 1996), transtorno de estresse pós-traumático (GRILLON; SOUTHWICK; CHARNEY, 1996) e dor (CODERRE; MELZACK, 1992) foram todos implicados nos mecanismos de sensibilização. O termo sensibilização se refere ao desenvolvimento ao longo do tempo de uma exagerada resposta patológica a um estímulo inicialmente inócuo ou sublimiar (i.e. o estímulo que inicialmente não elicitou um comportamento incomum ou resposta fisiológica). Para o desenvolvimento da sensibilização a um determinado estímulo, este deve ser repetido ao longo do tempo. Uma vez que a resposta patológica tenha se desenvolvido frente ao estímulo, ela pode persistir durante toda a vida do organismo. O termo abrasamento originalmente se refere a um tipo muito específico de processo de sensibilização: o desenvolvimento de convulsões em resposta

a um estímulo elétrico ou químico repetitivo. A palavra abrasamento é agora mais amplamente utilizada para a transmissão do conceito de desenvolvimento de hipersensibilidade persistente a um dado estímulo (KRAUS, 2000).

A importância do fenômeno da sensibilização na psiquiatria atual torna o entendimento das bases do abrasamento imperativo. Do mesmo modo, o entendimento de alguns dos substratos moleculares identificados no modelo do abrasamento na epilepsia deve servir para ajudar no desenvolvimento de hipóteses considerando o mecanismo de sensibilização nas doenças psiquiátricas (KRAUS, 2000).

Um dos eventos que chama atenção para a importância do entendimento do abrasamento é o fato de que na psiquiatria, os anticonvulsivantes possuem um espectro de ação amplo que inclui bulimia nervosa, transtornos da compulsão alimentar periódica (APPOLINARIO; BACALTCHUK, 2002), do pânico, de estresse pós-traumático (LITTEN et al., 2005), de controle dos impulsos (ZULLINO et al., 2004) e os casos refratários de transtorno afetivo bipolar (MORENO et al., 2004), portanto anticonvulsivantes teriam um efeito anti-abrasamento (GODDARD; MCINTYRE; LEECH, 1969; BALLENGER; POST, 1978; LECHTENBERG; WORNER, 1991; MOAK; ANTON, 1996; MCNAMARA; WADA, 1997; BECKER, 1998), o que os torna importantes fármacos para a prevenção da recaída nos transtornos psiquiátricos.

Com relação às bases biológicas o abrasamento é um modelo de plasticidade sináptica, porém o único em que uma alteração transsináptica progressiva e permanente, na organização cerebral, é induzida, mais que isso, é um modelo experimental de estimulações repetidas breves no qual a natureza progressiva da epileptogênese pode ser caracterizada. É um exemplo, através do qual uma seqüência de processos atividade-dependente aumenta os déficits neurológicos com o aumento do número de convulsões. Inicialmente, alterações na transmissão sináptica por este tipo de convulsão evoluem para a reorganização morfológica de neurônios e circuitos neurais, especialmente no hipocampo, levando a déficits funcionais e ao aumento da susceptibilidade à convulsão (RACINE, 1972; STAFSTROM; SUTULA, 2005).

Uma vez que o estímulo induzido atinja um nível crítico, ou seja, acima do limiar de convulsão, estruturas do tronco cerebral que dirigem a resposta motora esquelética são ativadas e a convulsão em si é iniciada (GILBERT, 2001). Estas convulsões induzidas pelo abrasamento envolvem episódios motores associados a crises tônico-clônicas unilateral e bilateral com movimento de *rearing* e queda. Uma

variedade de manifestações fisiológicas e comportamentais acompanha a progressão do estágio do abrasamento (POST, 2002).

Existem muitos compostos químicos (drogas de abuso bem como agentes farmacológicos) com uma variedade de ações primárias no SNC, que podem levar a convulsões por uma exposição aguda em altas doses. Similarmente, propriedades pró-convulsivantes de muitas dessas substâncias podem ser demonstradas através de doses sublimiáres diárias um padrão de abrasamento semelhante às estimulações elétricas descritas por Goddard (1967) (GILBERT, 1992). O abrasamento induzido por cocaína tem sido reconhecido como um modelo vantajoso para o estudo da fisiopatologia e toxicidade associado com o abuso desta droga (MILLER et al., 2000), no qual o seu uso prolongado além de potencializar a convulsão (DHUNA; PASCUAL-LEONE; LANGENDORF, 1991), relaciona-se aos ataques violentos e transtorno de pânico (POST et al., 1987). Assim, o valor do modelo do abrasamento parece residir na sua utilidade de conceituar os processos que estão envolvidos no curso longitudinal do desenvolvimento e progressão de síndromes neuropsiquiátricas (POST, 2007).

Apenas recentemente o abrasamento induzido por nicotina foi caracterizado. Neste estudo (BASTLUND et al., 2005) foi demonstrado que repetidas injeções de baixas doses de nicotina são capazes de induzir convulsões em camundongos, sendo o primeiro e único trabalho publicado até o momento nesta temática. Estes autores mostraram que a administração de nicotina a camundongos na dose de 2,3 mg/kg de segunda à sexta-feira foi capaz de induzir o abrasamento e que drogas como levetiracetam, tiagabina e fenitoína puderam inibir o desenvolvimento deste fenômeno.

Através da interação com os receptores nicotínicos no SNC, a nicotina modula vários genes e vias celulares em neurônios. Esta droga é capaz de promover um aumento na expressão de genes imediatos como *c-Fos*, *c-Jun*, *Nurr-77* (ou fator de crescimento neural IB) e *Egr1* (ICHINO et al., 2002; SHIM et al., 2001), que estão relacionados, respectivamente à ativação neuronal – *c-Fos*, ativação da transcrição dependente de cálcio (um mecanismo chave através do qual neurônios retêm a informação que recebem do meio ambiente) – *c-Jun*, mediação do ciclo celular, inflamação e apoptose – *Nurr-77* e acoplamento de sinais extracelulares a alterações da expressão de genes pela célula – *Egr1*. A nicotina também é capaz de modular a liberação de inúmeros neurotransmissores, assim participa da regulação de vários processos fisiológicos (WANG et al., 2009).

A ativação de receptores nicotínicos tem sido implicada na fisiopatologia da convulsão por nicotina. Esta parece ser mediada principalmente pela subunidade  $\alpha 7$  dos receptores nicotínicos (DAMAJ et al., 1999), entretanto estudos recentes usando camundongos geneticamente modificados concluíram que as subunidades  $\alpha 3$  e  $\beta 4$  também são requeridas (SALAS et al., 2004). Esta ativação induzida pela nicotina traz alterações na concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de forma direta, que também está envolvido no mecanismo da convulsão, pela regulação da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através do receptor, ou de forma indireta, pela despolarização da membrana induzida por estimulação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes, produzindo um aumento do conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre (DAMAJ et al., 1999). Este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular leva ao aumento da liberação de glutamato, resultando na hiperativação de receptores NMDA, o que, então, leva a cascata de eventos relacionados à convulsão (DAMAJ et al., 1999). Além disso, o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  parece influenciar a liberação de NO, através da estimulação da NOS dentro da célula, participando também da fisiopatologia da convulsão (POGUN et al., 2000).

Os receptores NMDA parecem exercer um papel crucial no desenvolvimento do abasamento. Antagonistas deste receptor inibem convulsões durante a iniciação deste fenômeno indicando, assim, a importância das respostas mediadas pelo mesmo (LUKOMSKEYA et al., 2007).

Existem evidências que os hormônios sexuais podem modular os efeitos da nicotina e receptores nicotínicos de formas diferentes (DAMAJ, 2001). Foi sugerido que ratas se auto-administram nicotina mais rapidamente e se esforçam mais para obter esta droga do que os machos provavelmente devido a um aumento dos receptores nicotínicos (KOYLU et al., 1997; LYNCH; ROTH; CARROLL, 2002). Diferenças sexuais alteram a cinética da nicotina, ou seja, seu metabolismo, pois estudos relatam que ratos eliminam nicotina mais rapidamente que as ratas (NWOSO; CROOKS, 1988), assim, tornando as fêmeas mais vulneráveis aos efeitos desta droga. Esses achados estão de acordo com os resultados comportamentais apresentados neste trabalho, nas quais as fêmeas adultas e periadolescentes desenvolveram o abasamento antes do término do tratamento, sendo que estas últimas foram mais susceptíveis aos seus efeitos tóxicos da droga, enquanto machos, principalmente na periadolescência apresentaram maior resistência ao desenvolvimento do abasamento.

A iniciação e propagação da convulsão também podem ser influenciadas por hormônios sexuais (BUTTERBAUGH, 1987). Acreditou-se por muitas décadas que o

estrógeno induzia ações somente excitatórias no SNC, entretanto recentes estudos mostraram que este hormônio feminino apresenta efeitos contraditórios na convulsão, podendo ser tanto excitatório quanto inibitório (VELÍSKOVÁ, 2006; 2007). Logothetis et al. (1959) demonstraram que a administração de altas doses de estrógeno em mulheres induziu a atividade epileptiforme rápida e exacerbação das convulsões durante a fase pré-menstrual, existindo uma correlação positiva entre os níveis de estrógeno e a exacerbação da convulsão. Já em um estudo-piloto a administração de estrógeno não aumentou eletroencefalograficamente (EEG) a atividade cerebral em mulheres com epilepsia (JANOUSEK et al., 2006). Apesar da dualidade, os efeitos excitatórios do estradiol podem estar relacionados com a sua capacidade de aumentar as correntes dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, NMDA e AMPA (FOY et al., 1999).

A progesterona, por sua vez, demonstrou uma ação anticonvulsivante contra convulsões tônico-clônicas generalizadas, mas exacerbou crises de ausência em mulheres (MORAN; SMITH, 1998). Quanto à testosterona, há estudos mostrando suas ações protetoras e pró-convulsivas em modelos experimentais de epilepsia (EDWARDS; BURNHAM; MACLUSKY, 1999).

Baseado no fato de que machos periadolescentes apresentaram maior resistência ao desenvolvimento do abasamento é importante mencionar que a adolescência é um período desenvolvimental crítico, sendo que a exposição à nicotina nesta fase induz mudanças comportamentais e moleculares que são notavelmente diferentes daquelas observadas em sujeitos expostos a esta mesma droga em um momento mais tardio na vida (ADRIANI et al., 2003). Nicotina parece causar efeitos diversos no cérebro de ratos adolescentes, incluindo alteração na proliferação, diferenciação, atividade sináptica, maturação sináptica e aumento do dano e morte celular (ABREU-VILLAÇA et al., 2003). Interessantemente, conforme outrora mencionado nós observamos neste estudo que os machos periadolescentes foram mais resistentes ao desenvolvimento do abasamento do que os adultos, enquanto as fêmeas da mesma fase tiveram um alto índice de morte.

A administração crônica de substâncias com potencial de causar dependência a roedores resulta em mudanças neurais que, até o momento, não foram totalmente caracterizadas. Exemplos são o aumento do número de receptores nicotínicos e a modulação da sinalização excitatória de neurônios dopaminérgicos após a exposição crônica de nicotina. Estas mudanças se mostram idade-dependente e ratos periadolescentes, em geral, apresentam maiores respostas a esta droga do que os adultos

(PLACZEK; ZHANG; DANI, 2009). A exposição crônica à nicotina modula não apenas a expressão de receptores, mas também sua distribuição e composição de subunidades (LAJTHA; SERSHEN, 2010; EISILE et al., 1993), bem como o número, distribuição, sensibilização (WONNACOTT et al., 2000) e função geral destes receptores (ADRIANI et al., 2004).

Doura et al. (2008) estudaram a expressão de receptores nicotínicos  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 6$  e  $\alpha 7$  em cérebro de ratos periadolescentes e adultos após duas semanas de administração crônica de nicotina. Os níveis basais destes receptores no animal periadolescente foram maiores do que os do adulto, mas o aumento causado pela nicotina foi mais pronunciado neste último grupo. Mais especificamente, o aumento das subunidades  $\alpha 4\beta 2$  foi mais evidenciado no NAC e este aumento foi maior em animais adultos. Por outro lado, existiu uma redução da subunidade  $\alpha 6$  no NAC em ambos grupos.

O estudo do abasamento induzido por nicotina pode ser considerado interessante também por apresentar mostrar que a administração repetida desta droga não causa apenas tolerância, como evidenciado em trabalhos prévios, inclusive tolerância para os eventos convulsivos. Ao contrário, este mostra que dependendo da dose e tempo de administração a droga pode causar convulsões através do mecanismo de abasamento. Okamoto et al. (1992) observaram que a tolerância às convulsões induzidas pela nicotina em ratos foi estreitamente relacionada ao aumento de seus níveis cerebrais vistos após injeções diárias da mesma. Entretanto, este fenômeno não foi notado em nossos estudos, pois como as injeções ocorriam de segunda à sexta-feira, não percebemos nenhuma diminuição na resposta convulsiva da nicotina na segunda-feira, estando de acordo com os resultados publicados por Bastlund et al. (2005).

O estado de ativação prévia dos receptores nicotínicos, conforme citado anteriormente, leva a um aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, alterando assim, a homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$ . De acordo com Hidalgo e Donoso (2008) a relação entre o  $\text{Ca}^{2+}$  e a geração e sinalização das espécies reativas ao oxigênio (ERO) é um tópico novo em discussão no meio científico. De fato, alguns estudos mostram que a entrada sustentada de cálcio produz uma elevação na produção do estresse oxidativo mitocondrial, causando um desequilíbrio e que este contribui significativo dano celular neuronal (HIDALGO; DONOSO, 2008). Outros estudos têm mostrado também que a atividade elétrica neuronal promove uma sinalização de cálcio com aumento da produção das ERO. A estimulação elétrica neuronal induz a ativação recíproca da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$

mediado pelo receptor de rianodina e a geração de ERO, especificamente do peróxido de hidrogênio (RIQUELME et al., 2011).

Com base em que os receptores nicotínicos ativados e a estimulação elétrica neuronal aumentam os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , direta ou indiretamente, e isto está envolvido na produção de ERO, nós decidimos determinar a participação do estresse oxidativo, através da análise quantitativa de alguns parâmetros antioxidante como atividade da SOD, níveis de GSH, bem como a peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito/nitrato nos diferentes grupos estudados após a indução do abrasamento por nicotina (em animais machos e fêmeas periadolescentes e adultos).

Nossos resultados mostraram que a maior resistência dos ratos machos periadolescentes ao desenvolvimento do abrasamento pode estar relacionada, pelo menos em parte, ao aumento dos níveis das defesas antioxidantes observadas no cérebro destes animais, visto que houve uma elevação nos níveis de GSH no CPF e CE e nenhuma alteração na atividade da SOD, conteúdo de nitrito e peroxidação lipídica, sugerindo, portanto que este grupo apresenta um balanço antioxidante/pró-oxidante positivo. Ao contrário dos resultados obtidos com os machos periadolescentes, os demais grupos estudados apresentaram de uma maneira geral diminuição dos níveis de defesas antioxidantes, como GSH e SOD, desencadeando, portanto, o desequilíbrio oxidativo, e assim ao dano na membrana, detectado pela alteração na peroxidação lipídica em machos adultos e fêmeas periadolescentes, mas não em fêmeas adultas.

A maior parte das ERO é produzida pela respiração mitocondrial. Cerca de 1-2% da molécula de oxigênio consumida durante a respiração fisiológica normal é convertida em radicais superóxido. A redução de um elétron da molécula de oxigênio produz uma molécula relativamente estável, o ânion superóxido, que serve como precursor de muitas ERO (ANDREYEV; KUSHNAREVA; STARKOV, 2005). Radicais hidroxil, alcóxil, NO e peróxil, bem como outras moléculas que não são radicais livres, mas podem levar a sua produção através de reações químicas, como peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, fazem parte também destas ERO (PRATICO et al., 2001).

Os efeitos deletérios resultantes da formação das ERO são, em grande maioria, impedidos por vários sistemas antioxidantes (FRIDOVICH, 1995), que inclui os enzimáticos, como SOD e catalase, e defesas celulares não-enzimáticas como GSH, ascorbato (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), e outros. Entretanto, às vezes, a

produção de ERO pode ultrapassar a capacidade da célula para removê-los, resultando no desequilíbrio oxidativo, levando ao estresse oxidativo (PRATICO et al, 2001).

Até o momento não há dados mostrando o envolvimento do desequilíbrio oxidativo em modelos de abrasamento mais amplamente estudados, como o abrasamento induzido por cocaína e etanol. Há alguns artigos mostrando o aumento dos níveis de MDA e uma diminuição nos níveis de GSH (JAIN et al., 2011) bem como uma diminuição da atividade da SOD em córtex pré-frontal (ERAKOVIC et al., 2003) de ratos submetidos ao abrasamento por pentilenotetrazol (PTZ).

A primeira linha de defesa contra as ERO induzidas por nicotina na célula é promovida pela SOD. O superóxido é enzimaticamente convertido em peróxido de hidrogênio por uma família de metaloenzimas denominada SOD (FRIDOVICH, 1995). Das et al. (2009) mostraram que a atividade da SOD se apresentava bem diminuída em diferentes regiões cerebrais após a tratamento crônico com nicotina e que este evento ocorrer devido a uma superprodução do radical superóxido e peróxido de hidrogênio (potentes inibidores da atividade da SOD), em um modelo de toxicidade induzida pela nicotina.

GSH é a principal defesa antioxidante da célula. Esta atua diretamente retirando os radicais livres e protegendo as biomoléculas de seus ataques. Das et al. (2009), no mesmo modelo supracitado, mostraram uma diminuição nos níveis de GSH, que pode estar associado a uma diminuição de sua síntese e/ou aumento do seu consumo para retirar os radicais livres induzidos pela nicotina.

Nós observamos também que apenas nas fêmeas houve uma diminuição do conteúdo de nitrito/nitrato no HC e um aumento no PFC. Os níveis de óxido nítrico podem ser mensurados indiretamente pela determinação de nitrito/nitrato, desde que o NO passe por várias reações em fluidos biológicos resultando na formação de nitritos e nitratos. O NO é uma molécula sintetizada a partir da L-arginina na presença do co-fator NADPH pela ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) de curta duração. Existem 3 isoformas da enzima NOS, sendo uma induzível (iNOS) e duas expressadas constitutivamente (eNOS – endotelial e nNOS – neuronal) (BECKMAN ; KOPPENOL, 1996). No SNC, o NO atua como uma molécula de sinalização intracelular difusa (DAWSON; SNYDER, 1994). Exerce um significativo efeito inibitório na função do receptor de NMDA (MANZONI et al., 1992). Tem sido proposto que este efeito é mediado via redox no receptor NMDA, mas a interação com importantes cisteínas das subunidades do receptor NMDA foi descartada (AIZENMAN; POTTHOFF, 1999).

O papel do NO na convulsão tem sido amplamente investigado, usando vários inibidores e doadores de NO, no entanto, sabe-se que esta molécula age como modulador. Evidências sugerem também que ambas as isoformas, induzível e neuronal, participam em muitos processos neuronais importantes. A nicotina influencia a síntese e liberação de NO (VLEEMING; RAMBALI; OPPERHUIZEN, 2002), e parece que esta influência é através do aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A nicotina promove a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que estimularia a nNOS dentro da célula, cuja atividade depende da interação cálcio-calmodulina, resultando em um aumento na formação de NO (BICKER, 1996).

Tutka et al. (2007) mostraram que especificamente em convulsões induzidas por nicotina, 7-nitroindazol, um inibidor seletivo da nNOS, exerceu um efeito pró-convulsivante, ao passo que a aminoguanidina, um inibidor específico da iNOS, não apresentou efeito. Parece que em relação ao abrasamento induzido por nicotina, a alteração nos níveis de NO são dependentes da área específica estudada e que essas mudanças ocorrem principalmente em fêmeas. O aumento do conteúdo de nitrito/nitrato no CPF pode estar relacionado com a formação de peroxinitritos, um radical nitrito altamente ativo que pode afetar qualquer molécula celular (RADI et al., 1991).

A formação de grandes quantidades de ERO's pode iniciar a peroxidação lipídica, além de que o aumento na peroxidação lipídica pode ser devido a uma insuficiência no sistema antioxidante (RADI et al., 1991), fato este demonstrado em nossos resultados, nos quais as fêmeas periadolescentes e machos adultos apresentaram uma diminuição em suas defesas, e conseqüentemente, levando ao aumento da peroxidação lipídica detectados pelos níveis de MDA. A formação excessiva de ERO podem causar oxidação protéica em mitocôndrias cerebrais, oxidação no DNA e RNA, disfunção neuronal e morte (YILDIZ et al., 1999).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que os ratos machos periadolescentes são comportamentalmente mais resistentes ao abasamento induzido por nicotina, fato este que pode ter ocorrido, pelo menos em parte, devido a um aumento nas defesas antioxidantes apresentadas por estes animais nas diferentes áreas cerebrais estudadas. Pode-se também constatar que fêmeas periadolescentes são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da nicotina, embora este mecanismo não possa ser totalmente esclarecido através da análise dos parâmetros avaliados.

Portanto, a análise mais detalhada dos mecanismos que estão envolvidos nestas diferenças através das quais o cérebro feminino adolescente se mostra tão vulnerável ao passo que o masculino periadolescente é tão resistente aos efeitos da nicotina, certamente poderia abrir novos caminhos para decifrar a complexidade acerca da dependência de drogas e, possivelmente, contribuir para o seu tratamento.

## REFERÊNCIAS

- ABREU-VILLACA, Y; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Impact of adolescent nicotine exposure on adenylyl cyclase-mediated cell signaling: enzyme induction, neurotransmitter-specific effects, regional selectivities, and the role of withdrawal. **Brain Res.** v. 988, p. 164–172, 2003.
- ADRIANI, W.; SPIJKER, S.; DEROUCHE-GAMONET, V.; LAVIOLA, G.; LE MOAL, M.; SMIT, A. B.; PIAZZA, P. V. Evidence for enhanced neurobehavioral vulnerability to nicotine during periadolescence in rats, **J. Neurosci.**, v. 23, p. 4712–4716, 2003.
- ADRIANI, W.; GRANSTREM, O.; MACRI, S.; IZYKENOVA, G.; DAMBINOVA, S.; LAVIOLA, G. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. **Neuropsychopharmacology.** v. 29, p. 869-78, 2004.
- ADRIANI, W.; DEROUCHE-GAMONET, V.; LE, M. M, LAVIOLA, G.; PIAZZA, P. V. Preexposure during or following adolescence differently affects nicotine-rewarding properties in adult rats, **Psychopharmacology (Berl)**, v.184, p. 382–390, 2006.
- ANDREYEV, A.Y.; KUSHNAREVA, Y.E.; STARKOV, A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry (Mosc.)**, v. 70, p. 200–214, 2005.
- AIZENMAN, E., POTTHOFF, W.K. Lack of interaction between nitric oxide and the redox modulatory site of the NMDA receptor. **Br. J. Pharmacol**, v. 126, p. 296–300, 1999.
- APPOLINARIO, J.C., BACALTCHUK, J. Tratamento farmacológico dos transtornos alimentares. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 24, p. 54-9, 2002.
- BALFOUR, D.J. The neurobiology of tobacco dependence: a preclinical perspective on the role of the dopamine projections to the nucleus accumbens. **Nicotine Tob Res**, v. 6, p. 899-912, 2004.
- BALLENGER, J.C., POST, R.M. Kindling as a model for alcohol withdrawal episodes and the severity of subsequent withdrawal seizures. **Psychopharmacology**, v. 116, p. 26-32, 1978.
- BANERJEE, P.N., HAUSER, W.A. Incidence and prevalence. In: Engel Jr J, Pedley TA, eds. **Epilepsy: a comprehensive textbook**, 2nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 45-56, 2008.
- BASTLUND, J.F., BERRY, D., WATSON, W.P. Pharmacological and histological characterisation of nicotine-kindled seizures in mice. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 975-83, 2005.
- BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M., DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v. 29, p. 113-23, 2006.

- BECKE, J.B., HU, M. Sex Differences in Drug Abuse. **Front Neuroendocrinol**, v. 29, p. 36–47, 2008.
- BECKER, H.C. The alcohol withdrawal “kindling” phenomenon: clinical and experimental findings. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, p. 121–124, 1996.
- BECKER, H.C. Kindling in Alcohol Withdrawal. **Alcohol Health Res World**, v. 22, p. 25-32, 1998.
- BECKMAN, J.S., KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, p. 1424-37, 1996.
- BEN-ARI, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**, v. 14, p. 375-403, 1985.
- BENOWITZ, N., HATSUKAMI, D. Gender differences in the pharmacology of nicotine addiction. **Addict Biol**, v. 3, p. 383–404, 1998.
- BENOWITZ, N.L. Cigarette smoking and nicotine adiction. **Med Clin North Am**, v. 76, p. 415-37, 1992.
- BENOWITZ, N.L. Nicotine safety an toxicity. **Oxford Univ. Press**. N. York, 1998.
- BENOWITZ, N.L. Nicotine addiction. **Prim Care**, v. 26, p. 611–631, 1999.
- BERRA, C.M., MENCK, C.F.M., DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controe no ciclo celular. **Quim. Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.
- BERTRAM, E. The relevance of kindling for epilepsy human. **Epilepsia**, v. 48, p. 65–74, 2007.
- BHAGWAT, S.V., VIJAYASARATHY, C., RAZA, H., MULLICK, J., AVADHANI, N.G. Preferential effects of nicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone on mitochondrial glutathione S-transferase A4-4 induction and increased oxidative stress in the rat brain. **Biochem Pharmacol**, v. 56, p. 831–839, 1998.
- BICKER, G. Transmitter-induced calcium signalling in cultured neurons of the insect brain. **J Neurosci Methods**. v.69, p. 33-41, 1996.
- BLUMENFELD, H., LAMPERT, A., KLEIN, J.P., MISSION, J.,CHEN, M.C., RIVERA, M., DIB-HAJJ, S., BRENNAN, A.R., HAINS, B.C., WAXMAN, S.G. Role of hippocampal sodium channel Nav1.6 in kindling epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 50, p.44–55, 2009.
- BOOZE, R.M., WELCH, M.A., WOOD, M.L., BILLINGS, K.A., APPLE, S.R., MACTUTUS, C.F. Behavioral sensitization following repeated intravenous nicotine administration: Gender differences and gonadal hormones. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 64, p. 827– 839, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRODIE, M.S. Low concentrations of nicotine increase the firing rate of neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. In: Adlkofer F, Thurau K, eds. Effects of nicotine on biological systems. **Birkhäuser: Basel**; p. 373, 1991.

BUTTERBAUGH, G.C. Postictal events in amygdala-kindled female rats with and without estradiol replacement. **Exp. Neurol**, v. 95, p. 697–713, 1987.

CAZA, P., STEINERT, P.A., SPEAR, N.E. Comparison of circadian susceptibility to LiCl-induced taste aversion learning between preweanling and adult rats. **Physiol Behav**, v. 25, p. 389-96, 1980.

CHANG, B.S., LOWENSTEIN, D.H. Epilepsy. **N Engl J Med**, v. 349, p. 1257–1266, 2003.

CHIARI, A., TOBIN, J.R., PAN, H.L., HOOD, D.D., EISENACH, J.C. Sex differences in cholinergic analgesia I. **Anesthesiology**, v. 91, p. 447–454, 1999.

CODERRE, T.J., MELZACK, R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J Neurosci**, v. 12, p. 3671–3675, 1992.

COLLINS, S.L., IZENWASSER, S. Chronic nicotine differentially alters cocaine-induced locomotor activity in adolescent vs. adult male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 46, p. 349–62, 2004.

CUI, Y., WEN, W., MORIARTY, C.J., LEVINE, R.S. Risk factors and their effects on the dynamic process of smoking relapse among veteran smokers, **Behav Res Ther**, v. 44, p. 967–981, 2006.

CRUZ, F.C., DELUCIA, R., PLANETA, C.S. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 80, p. 411–417, 2005.

DAMAJ, M.I. Influence of gender and sex hormones on nicotine acute pharmacological effects in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, p. 132-140, 2001.

DAMAJ, M.I., GLASSCO, W., DUKAT, M., MARTIN, B.R. Pharmacological characterization of nicotine-induced seizures in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 291, p. 1284–1291, 1999.

DAS, S., GAUTAM, N., SANKAR, K.D., MAITI, T., ROY, S. Oxidative stress in the brain of nicotine-induced toxicity: protective role of *Andrographis paniculata* Nees and vitamin E. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** v. 34, p. 124–135, 2009.

- DAWSON, T.M., SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci**, v. 14, p. 5147–5159, 1994.
- DHUNA, A., PASCUAL-LEONE, A., LANGENDORF, F. Chronic, habitual cocaine abuse and kindling-induced epilepsy: a case report. **Epilepsia**. v. 32, p. 890-894, 1991.
- DIFRANZA, J.R. Hooked from the first cigarette. **J Fam Prac**, v. 56, p. 1017–22, 2007.
- DOURA, M.B., GOLD, A.B., KELLER, A.B., PERRY, D.C. Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure, **Brain Res**, v. 1215, p. 40–52, 2008.
- DUNCAN, G.E., SHEITMAN, B.B., LIEBERMAN, J.A. An integrated view of pathophysiological models of schizophrenia. **Brain Res Rev**, v. 29, p. 250–264, 1999.
- EDWARDS, H.E., BURNHAMW, MACLUSKY, N.J. Testosterone and its metabolites affect afterdischarge thresholds and the development of amygdale-kindled seizures. **Brain. Res**, v. 838, p. 151–157, 1999.
- EISELE, J.L., BERTRAND, S., GALZI, J.L., DEVILLERS-THIERY, A., CHANGEUX, J.P., BERTRAND, D. Chimaeric nicotinicserotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. **Nature**. v. 366, p. 479–483, 1993.
- ENGEL, J.J., PEDLEY, T.A. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008.
- ERAKOVIC, V.V., ZUPAN, G., VARLJEN, J., SIMONIC, A. Pentylentetrazolinduced seizures and kindling: changes in free fatty acids, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activity, **Neurochem. Int**. v. 42, p. 173–178, 2003.
- ERDTMANN-VOURLIOTIS, M., RIECHERT, U., MAYER, P., GRECKSCH, G., HÖLLT, V. Pentylentetrazole (PTZ)-induced c-fos expression in the hippocampus of kindled rats is suppressed by concomitant treatment with naloxone. **Brain Res**, v. 11, p. 299-308, 1998.
- FATTAL, O., BUDUR, K., VAUGHAN, A.J., FRANCO, K. Review of the literature on major mental disorders in adult patients with mitochondrial diseases. **Psychosomatics** 47:1–7, 2006.
- FEDELE, E., VARNIER, G., ANSALDO, M.A., RAITERI, M. Nicotine administration stimulates the in vivo N-methyl-D-aspartate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat hippocampus through glutamate release. **Br J Pharmacol**, v. 125, p. 1042–1048, 1998.
- FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, p. 61-8, 1997.

FOCCHI, G. R.A. Tabagismo: Uma revisão. **Psychiatry On-line Brazil**, v. 8, 2003.

FOY, M.R., XU, J., XIE, X., BRINTON, R.D., THOMPSON, R.F., BERGER, T.W. 17L-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. **J. Neurophysiol**, v. 81, p. 925-929, 1999.

FRENCH JA, WILLIANSOON PD, THADANI VM, DARCEY, T.M., MATTSON, R.H., SPENCER, S.S., SPENCER, D.D. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. **Ann Neurol**. v. 34:774-80, 1993.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem**, v. 64, p. 97–112, 1995.

GALDUROZ, J.C.F., NATO, A.R., NAPO, A.S., CARLINI, E.A. I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil:Estudo Envolvendo as 107 Maiores Cidades do País – 2001. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 13, p. 888-95, 2005.

GHAEMI, S.N., BOIMAN, E.E., GOODWIN, F.K. Kindling and second messengers: an approach to the neurobiology of recurrence in bipolar disorder. **Biol Psychiatry**, v. 45, p. 137–144, 1999.

GILBERT, M.E. Does the Kindling Model of Epilepsy Contribute to Our Understanding of Multiple Chemical Sensitivity. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 933, p. 68-91, 2001.

GILBERT, M.E. Neurotoxicants and limbic kindling. **In The Vulnerable Brain and Environmental Risks**. Vol. 1: Malnutrition and Hazard Assessment, p. 173–192, 1992.

GODDARD, G.V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, v. 214, p. 1020-1021, 1967.

GODDARD, G.V., MCINTYRE, D.C., LEECH, C.K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Exp. Neurol**, v. 25, p. 295–330, 1969.

GONZALEZ, L.P., VEATCH, L.M., TICKU, M.K., BECKER, H.C. Alcohol withdrawal kindling: mechanisms and implications for treatment. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, p. 197-201, 2001.

GOODMAN, J. H., GILMAN, A.G. **As Bases farmacológicas da terapêutica**. 10º ed. Editora McGraw Hill, Rio de Janeiro, 2005.

GREEN, L.C., TANNENBAUN, S.R., GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in Parkinson's disease using the model of the 6-hydroxydopamine and MPTP. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v. 899, p. 262-273, 2000.

GRILLON, C., SOUTHWICK, S.M., CHARNEY, D.S. The psychobiological basis of posttraumatic stress disorder. **Mol Psychiatry**, v. 1, p. 278–297, 1996.

GUERREIRO, C.A.M., GUERREIRO, M.M., CENDES, F., LOPES, C.I. **Epilepsia**. Lemos Editorial, São Paulo, 2000.

GUPTA, R.C. Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbamates. **Toxicol. Mech. Methods**, v. 14, p. 103-143, 2004.

HANNESSON, D.K., CORCORAN, M.E. The mnemonic effects of kindling. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p. 725-751, 2000.

HEISHMAN, S.J., TAYLOR, R.C., HENNINGFIELD, J.E. Nicotine and smoking: a review of effects on human performance. **Exp Clin Psychopharmacol**, v. 2, p. 345-95, 1994.

HIDALGO, C., DONOSO, P. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, p. 1275-1312, 2008.

HIYOSHI, T., WADA, J.A. Lasting nature of both transfer and interference in amygdaloid kindling in cats: observation upon stimulation with 11-month rest following primary site kindling. **Epilepsia**, v. 33, p. 222-227, 1992.

HUANG, S.H., LEONARD, S., SHI, X., GOINS, M.R., VALLYATHAN, V. Antioxidant activity of lazaroid (U-75412E) and its protective effects against crystalline silica-induced cytotoxicity. **Free Radic Biol Med**, v. 24, p. 529-36, 1998.

ICHINO, N., YAMADA, K., NISHII, K., SAWADA, H., NAGATSU, T., ISHIGURO, H. Increase of transcriptional levels of *egr-1* and *nur77* genes due to both nicotine treatment and withdrawal in pheochromocytoma cells. **J Neural Transm.** v. 109, p. 1015–1022, 2002.

ITZHAK, Y. Attenuation of cocaine kindling by 7-nitroindazole, an inhibitor of brain nitric oxide synthase. **Neuropharmacology**. v. 35, p.1065-73, 1996.

ITZHAK, Y., MARTIN, J.L. Cocaine-induced kindling is associated with elevated NMDA receptor binding in discrete mouse brain regions. **Neuropharmacology**, v.39 p 32-9, 2000.

JAIN, S., BHARAL, N., KHURANA, S., MEDIRATTA, P.K., SHARMA, K.K. Anticonvulsant and antioxidant actions of trimetazidine in pentylenetetrazole-induced kindling model in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 383, p. 385-92, 2011.

JANOUSEK, J., BARBER, A., KLEIN, P. Use of Premarin as a seizure precipitant in subjects undergoing LTV EEG monitoring for pre-surgical work up. **Epilepsia Suppl.**, Annual AES meeting abstracts: Abst. 3.145, 2006.

KEDMI, M., BEAUDET, A.L., ORR-URTEGER, A. Mice lacking neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4-subunit and mice lacking both alpha5- and beta4-subunits are highly resistant to nicotine-induced seizures. **Physiol Genomics**, v. 13, p. 221-229, 2004.

KOTLOSKI, R., LYNCH, M., LAUERSDORF, S., SUTULA, T. Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 95-110, 2002.

KOYLU, E., DEMIRGOREN, S., LONDON, E.D., POGUN, S. Sex difference in upregulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. **Life Sci**, v. 61, p. 185-190, 1997.

KRAUS, J.E. Sensitization Phenomena in Psychiatric Illness: Lessons from the Kindling Model. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 12, p. 328–343, 2000.

KWAN, P., SANDER, J.W. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 75, p. 1376–81, 2004.

LAJTHA, A., SERSHEN, E. Nicotine: alcohol reward interactions, **Neurochem**, v. 35, p. 1248–1258, 2010.

LECHTENBERG, R., WORNER, T.M. Relative kindling effect of detoxification and non-detoxification admissions in alcoholics. **Alcohol Alcoholism**, v. 26, p. 221-5, 1991.

LEVIN, E.D., REZVANI, A.H., MONTOYA, D., ROSE, J.E., SWARTZWELDER, H.S. Adolescent-onset nicotine self-administration modeled in female rats. **Psychopharmacology**, v. 169, p. 141–9, 2003.

LITTLE, H.J., NUTT, D.J., TAYLOR, S.C. Selective changes in the in vivo effects of benzodiazepine receptor ligands after chemical kindling with FG 7142. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 25-31, 1987.

LITTEN, R.Z., FERTIG, J., MATTSON, M.E., EGLI, M. Development of medications for alcohol use disorders: recent advances and ongoing challenges. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 10, p. 323-43, 2005.

LIU, D.S., O'BRIEN, T.J., WILLIAMS, D.A., HICKS, R.J., MYERS, D.E. Lamina-specific changes in hippocampal GABA(A)/cBZR and mossy fibre sprouting during and following amygdala kindling in the rat. **Neurobiol Dis**, v. 35, p.337–347, 2009.

LOGOTHETIS, J., HARNER, R., MORREL, F., TORRES, F. The role of estrogens in catamenial exacerbation of epilepsy. **Neurology**, v. 9, p. 352–360, 1959.

LOSCHER, W., HEIDRUN, P., PIOTR, W., WOJCIECH, D., CHRISTOPHER, G.P. Are neuronal nicotinic receptors a target for antiepileptic drug development? Studies in different seizure models in mice and rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 466, p. 99–111, 2003.

LUKOMSKAYA, N.Y., LAVRENT'eva, V.V., STARSHINOVA, L.A., ZHABKO, E.P., GORBUNOVA, L.V., TIKHONOVA, T.B., GMIRO, V.E., MAGAZANIK, L.G. Effects of ionotropic glutamate receptor channel blockers on the development of pentylenetetrazol kindling in mice. **Neurosci Behav Physiol**, v. 37, p. 75-81, 2007.

LYNCH, W.J., ROTH, M.E., CARROLL, M.E. Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. **Psychopharmacology**, v.164, p. 121–137, 2002.

MANZONI, O., PREZEAU, L., MARIN, P., DEHAGER, S., BOCKAERT, J., FAGNI, L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. **Neuron**, v. 8, p. 653–662, 1992.

MARGERISON, J.H., CORSELLIS, J.A.N. Epilepsy and the temporal lobes: a clinical encephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. **Brain**, v. 89, p. 499-530, 1966.

MARQUES, ACPR, CAMPANA, A., GIGLIOTTI, A.P., LOURENÇO, M.T.C, FERREIRA, M.P., LARANJEIRA, R. Consenso sobre o tratamento da dependência de nicotina. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 23, p. 200-14, 2001.

MASON, C.R., COOPER, R.M. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. **Epilepsia**, v. 13, p. 663-74, 1972.

MATAGNE, A., KLITGAARD, H. Validation of corneally kindled mice: a sensitive screening model for partial epilepsy in man. **Epilepsy Res**, v. 31, p. 59-71, 1998.

MCINTYRE, D.C., POULTER, M.O., GILBY, K. Kindling: some old and some new. **Epilepsy Res**, v. 50, p. 79–92, 2002.

MCNAMARA, J.O., WADA, J.A. Kindling model. In: Engel J, Pedley TA, editors. **Epilepsy: a Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997.

MELDRUM, B.S., BRUTON, C.J. Epilepsy. In: **Greenfiels neuropathology**. 5th ed. Oxford, England: Oxford University Press; p. 1246-83, 1992.

MILLER, K.A., WITKIN, J.M., UNGARD, J.T., GASIOR, M. Pharmacological and behavioral characterization of cocaine-kindled seizures in mice. **Psychopharmacology**, v. 148, p. 74-82, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria SAS/MS N° 492, de 23 de setembro de 2010. [portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt\\_epilepsia .pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_epilepsia.pdf)  
Acesso em: 15 de janeiro de 2011

MOAK, D.H., ANTON, R.F. Alcohol-related seizures and the kindling effect of repeated detoxifications: the influence of cocaine. **Alcohol Alcoholism**, v. 31, p. 135-43, 1996.

MODY, I., SCHWARTZKROIN, P.A. Acute seizures models (intact animals). In: **Epilepsy: a comprehensive textbook**, eds. J. Engel Jr., TA Pedley, p. 397-404, Lippincott-Raven Publishers, 1997.

MONTGOMERY, A.J., LINGFORD-HUGHES, A.R., EGERTON, A., NUTT, D.J., GRASBY, P.M. The effect of nicotine on striatal dopamine release in man: A [<sup>11</sup>C]raclopride PET study. **Synapse**, v. 61, p. 637-45, 2007.

MORAN MH, SMITH SS. Progesterone withdrawal I: proconvulsant effects. **Brain Res**, v. 807, p. 84–90, 1998.

MORENO, R.A., MORENO, D.H., SOARES, M.B.M, RATSKE, R. Anticonvulsivantes e antipsicóticos no tratamento do transtorno bipolar. **Rev Bras Psiq**, v. 26, p. 37-43, 2004.

MORIMOTO, K., FAHNESTOCK, M., RACINE, R.J., LIU, J.L. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Prog Neurobiol**, v. 73, p. 1–60, 2004.

NUTT, D.J., COWEN, P.J., BATTS, C.C., GRAHAME-SMITH, D.G., GREEN, A.R. Repeated administration of subconvulsant doses of GABA antagonist drugs. I. Effect on seizure threshold (kindling). **Psychopharmacology**, v. 76, p. 84-7, 1982.

NWOSO, C., CROOKS, P.A. Species variation and stereoselectivity in the metabolism of nicotine enantiomers. **Xenobiotica**, v. 18, p. 1361–1372, 1988.

OKAMOTO, M., KITA, T., OKUDA, H., NAKASHIMA, T. Tolerance to the convulsions induced by daily nicotine treatment in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 59, p. 449-455, 1992.

OLFERT, E.D et al. **Guide to the Care and Use of Experimental Animals**, volume 1, 2nd edn. Canadian Council on Animal Care: 1993.

PAULY, J.R. Gender differences in tobacco smoking dynamics and the neuropharmacological actions of nicotine. **Front Biosci**, v. 13, p. 505–16, 2008.

PERKINS, K., DONNY, E., CAGGIULA, A. Sex differences in nicotine effects and self-administration: Review of human and animal evidence. **Nicotine Tob Res**, v. 1, p. 301–315, 1999.

PERKINS, K.A., SCOTT, J. Sex differences in long-term smoking cessation rates due to nicotine patch. **Nicotine Tob Res**, v.10, p. 1245–50, 2008.

PINEL, J.P.J., ROVNER, L.I. Experimental Epileptogenesis - Kindling-Induced Epilepsy in Rats: **Experimental Neurology**, v. 58, p. 190-202, 1978.

POGUN, S., DEMIRGOREN, S., TASKIRAN, D., KANIT, L., YILMAZ, O., KOYLU, E.O. Nicotine Modulates nitric oxide in rat brain. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 10, p. 463–472, 2000.

POST, R.M. Do the epilepsies, pain syndromes, and affective disorders share common kindling-like mechanisms? **Epilepsy Research**, v. 50, p. 203-219, 2002.

POST, R.M. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 858–87, 2007.

POST, R.M., KOPANDA, R.T. Letter: Cocaine, kindling, and reverse tolerance. **Lancet**, v. 15, p. 409-10, 1975.

POST, R.M., WEISS, S.R. Ziskind-Somerfeld Research Award. Endogenous biochemical abnormalities in affective illness: therapeutic versus pathogenic. **Biological Psychiatry**, v. 32, p. 469–484, 1992.

POST, R.M., WEISS, S.R., PERT, A., UHDE, T.W. Chronic cocaine administration: sensitization and kindling effects. In: Raskin, A., Fisher, S. (Eds.), *Cocaine: Clinical and Biobehavioral Aspects*. **Oxford University Press**, New York, p. 109-173; 1987.

POST, R.M., WEISS, S.R., PERT, A. Cocaine-induced behavioral sensitization and kindling: implications for the emergence of psychopathology and seizures. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 537, p. 292-308, 1988.

POTSCHKA, H., LÖSCHER, W. Corneal kindling in mice: behavioral and pharmacological differences to conventional kindling. **Epilepsy Res**, v. 37, p. 109-20, 1999.

PLACZEK, A.N., ZHANG, T.A., DANI, J.A. Age dependent nicotinic influences over dopamine neuron synaptic plasticity, **Biochem. Pharmacol**, v.78, p. 686–692, 2009.

PRATICÒ, D., URYU, K., LEIGHT, S., TROJANOSWKI, J.Q., LEE, V.M. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. **J Neurosci**, v. 15, p. 4183-7, 2001.

RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol**, v. 32, p. 281-294, 1972.

RACINE, R.J., MCINTYRE, D.C. Kindling mechanisms: current progress on an experimental epilepsy model. **Prog Neurobiol**, v. 27, p. 1-12, 1986.

RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M., FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J. Biol. Chem**, v. 266, p. 4244–4250, 1991.

RIQUELME, D., ALVAREZ, A., LEAL, N., ADASME, T., ESPINOZA, I., VALDE´S, J.A., TRONCOSO, N., HARTEL, S., HIDALGO, J., HIDALGO, C., CARRASCO, M.A. High-frequency field stimulation of primary neurons enhances ryanodine receptor-mediated  $Ca^{2+}$  release and generates hydrogen peroxide, which jointly stimulate NF- $\kappa$ B activity. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, p. 1245–1259, 2011.

ROSEMBERG, J. **Pandemia do tabagismo: Enfoques Históricos e Atuais**. São Paulo, 2002.

SALAS, R., ORR-URTREGER, A., BROIDE, R.S., BEAUDET, A., PAYLOR, R., DE BIASI, M. The nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 5 mediates short-term effects of nicotine in vivo. **Mol Pharmacol**, v. 63, p. 1059-66 2003.

SALAS, R., COOK, K.D., BASSETTO, L., DE BIASI, M. The alpha3 and beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunits are necessary for nicotine-induced seizures and hypolocomotion in mice. **Neuropharmacology**, v.47, p. 401-407, 2004.

SAMHSA. Substance Abuse and Mental Health Service Administration. Year-End preliminary Estimates from the 1996 Drug Abuse Warning Network. U. S. **Department of Health and Human Services Publications** no. (SMA). Rockville, MD. v. 98, p. 3175, 1997.

SAYIN, U., OSTING, S., HAGEN, J., RUTECKI, P., SUTULA, T. Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. **J Neurosci**, v. 23, p. 2759-68, 2003.

SATO, K., KASHIHARA, K., MORIMOTO, K., HAYABARA, T. Regional increases in brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNAs during amygdaloid kindling, but not in acidic and basist growth factor mRNAs. **Epilepsia**, v. 37, p. 6–14, 1996.

SENA, A., FERRET-SENA, V. Neurobiologia do uso de nicotina. In: Ferreira-Borges C, Filho HC (coords). **Usos, Abusos e Dependências: Tabagismo**. Lisboa: Climepsi Editores; 2004.

SHIM, I., JAVAID, J.I., WIRTSHAFTER, D., JANG, S.Y., SHIN, K.H., LEE, H.J. 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, p. 137–147, 2001.

SIDHPURA, N., REDFERN, P., WONNACOTT, S. Comparison of the effects of bupropion on nicotinic receptor-evoked [(3)H]dopamine release from rat striatal synaptosomes and slices. **Eur J Pharmacol**, v. 567, p.102-9, 2007.

SPEAR, L.P. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. **Alcohol Res Health**, v. 24, p. 115-23, 2000.

STAFSTROM, C.E., SUTULA, T.P. Models of epilepsy in the developing and adult brain: Implications for neuroprotection. **Epilepsy & Behavior**, v.7, p.18–24, 2005.

SULEYMAN, H et al. Beneficial effects of Hippophae rhamnoides L, on nicotine induced oxidative stress in rat blood compared with vitamin E. **Biol. Pharm. Bull**, v. 25, p.1133–1136, 2002.

SUN, Y., OBERLEY, LY. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clin. Chem., China**, v. 34, p. 497-500, 1988.

TAOLI, E., WYDNER, E.L. Effect of the age at which smoking begins on frequency in adulthood. **New Engl J Med**, v. 325, p. 968–9, 1991.

TESKEY, G.C., HUTCHINSON, J.E., KOLB, B. Sex differences en cortical plasticity and behavior following anterior cortical kindling in rats. **Cerebral córtex**, v.6, p. 675-682, 1999.

TUREGANO L et al. Histochemical study of acute and chronic intraperitoneal nicotine effects on several glycolytic and Krebs cycle dehydrogenase activities in the frontoparietal cortex and subcortical nuclei of the rat brain. **J Neurosci Res**, v. 64, p. 626–635, 2001.

TURSKI, W.A., CAVALHEIRO, E.A., SCHWARZ, M., CZUCZWAR, S.J., KLEINROK, Z., TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilorcapine in rats: behavioural electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v.9, p. 315-355, 1983.

TUTKA, P., BARCZYŃSKI, B., ARENT, K., MOSIEWICZ, J., MRÓZ, T., WIELOSZ, M. Different effects of nitric oxide synthase inhibitors on convulsions induced by nicotine in mice. **Pharmacol Rep**, v. 59, p.259-67, 2007.

VAN ETTEN, M.L., NEUMARK, Y.D., ANTHONY, J.C. Male-female differences in the earliest stages of drug involvement. **Addiction**, v. 94, p. 1413–9, 1999.

VELÍSKOVÁ, J. The role of estrogens in seizures and epilepsy: the bad guys or the good guys? **Neuroscience**, v. 138, p. 837–844, 2006.

VELÍSKOVÁ, J. Estrogens and epilepsy: why are we so excited? **Neuroscientist**, v. 13, p. 77–88, 2007.

VLEEMING, W., RAMBALI, B., OPPERHUIZEN, A. The role of nitric oxide in cigarette smoking and nicotine addiction. **Nicotine Tob Res**, v. 4, p. 341-348, 2002.

WANG, J., KIM, J.M., DONOVAN, D.M., BECKER, K.G. Significant modulation of mitochondrial electron transport system by nicotine in various rat brain regions. **Mitochondrion**, v. 9, p. 186–195, 2009.

WATKINS, S.S., KOOB, G.F., MARKOU, A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. **Nicotine Tob Res**, v. 2, p. 19-37, 2000.

WISE, R.A., HOFFMAN, D.C. Localization of drug reward mechanisms by intracranial injections. **Synapse**, v. 10, p. 247-63, 1992.

WONNACOTT, S., KAISER, S., MOGG, A., SOLIAKOV, L., JONES, I.W. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. **Eur. J. Pharmacol**, v. 393, p. 51–58, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy lifestyles**. Geneva: WHO; 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [homepage on the Internet]. **Geneva: World Health Organization** [cited 2009 Jul 6]. Report on the global Tobacco Epidemic 2008:

The MPOWER package. c2009; [Adobe Acrobat document, 41p.] Available from: [http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower\\_report\\_full\\_2008.pdf](http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf)

YACUBIAN, E.M.T., DACOSTA, J.C., PALMINI, A.L.F. **Tratamento medicamentoso das epilepsias**. Lemos Editorial, São Paulo, 2004.

YILDIZ, D., LIU, Y.S., ERCAL, N., ARMSTRONG, D.W. Comparison of pure nicotine and smokeless tobacco extract induced toxicities and oxidative stress. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**, v. 37, p. 434–439, 1999.

ZHANG, J., KAMDAR, O., LE, W., ROSEN, G., UPADHYAY, D. Nicotine Induces Resistance to Chemotherapy by Modulating Mitochondrial Signaling in Lung Cancer. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2008.

ZULLINO, D.F., KHAZAAL, Y., HATTENSCHWILER, J., BORGEAT, F., BESSON, J. Anticonvulsant drugs in the treatment of substance withdrawal. **Drugs Today**, v. 40, p. 603-19, 2004.