



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Fernanda Uchoa Braga

**Efeitos neuroquímicos no sistema colinérgico e dopaminérgico do uso da
vareniclina em um modelo animal de exposição à fumaça do cigarro
durante a adolescência**

Rio de Janeiro

2022

Fernanda Uchoa Braga

Efeitos neuroquímicos no sistema colinérgico e dopaminérgico do uso da vareniclina em um modelo animal de exposição à fumaça do cigarro durante a adolescência

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de mestre ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B813 Braga, Fernanda Uchoa.
Efeitos neuroquímicos no sistema colinérgico e dopaminérgico do uso da vareniclina em um modelo animal de exposição à fumaça do cigarro durante a adolescência / Fernanda Uchoa Braga - 2022.
89 f.

Orientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Produtos do Tabaco. 2. Vareniclina – Efeitos adversos – Teses. 3. Neuroquímica – Adolescência. I. Manhães, Alex Christian. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.84-053.6

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Fernanda Uchoa Braga

Efeitos neuroquímicos no sistema colinérgico e dopaminérgico do uso da vareniclina em um modelo animal de exposição à fumaça do cigarro durante a adolescência

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de novembro de 2022.

Orientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Yael de Abreu Villaça
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Bruna Lotufo Denucci
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Paula Campello Costa Lopes
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Este trabalho é todo dedicado aos meus pais, pois é graças ao seu esforço que hoje posso concluir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alex C. Manhães, do Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas do IBRAG/UERJ, por todo apoio, incentivo e confiança para que este trabalho pudesse ser realizado com sucesso.

Agradeço ao Me. Vitor Duarte do Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas do IBRAG/UERJ por toda a parceria e apoio emocional em todas as áreas da minha vida desde que eu entrei para este laboratório.

Agradeço à Dra Jemima Isnardo do Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas do IBRAG/UERJ por me fornecer diversos conhecimentos e técnicas essenciais para execução do projeto.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Regina Kubrusly pelos ensinamentos, pela parceria e pela constante energia positiva que cativa a todos em sua volta.

Agradeço a Ma. Camila Kishner, ao Prof. Dr. André e a toda equipe do laboratório de neurofisiologia, por tornar nosso dia a dia mais leve.

Agradeço à minha família e amigos, por toda compreensão e apoio emocional desde que iniciei no mestrado.

RESUMO

BRAGA, Fernanda Uchoa. *Efeitos neuroquímicos no sistema colinérgico e dopaminérgico do uso da vareniclina em um modelo animal de exposição à fumaça do cigarro durante a adolescência*. 2022. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O tabagismo é considerado, atualmente, como a principal causa de morte evitável no mundo. Embora diversos países estejam apresentando queda expressiva do número de usuários, o uso de produtos derivados do tabaco ainda é um grande problema de saúde pública mundial. A nicotina é a principal substância presente nas folhas de tabaco, sendo amplamente apontada como responsável pelo desenvolvimento da dependência. Infelizmente, o hábito de fumar inicia-se durante a adolescência para a maioria dos usuários, sendo este um dos motivos apontados como responsável pelo uso crônico ao longo da adulta, gerando inúmeros prejuízos em longo prazo. Não obstante, as abordagens farmacoterapêuticas são iniciadas somente na idade adulta devido à escassez de informações sobre os efeitos do uso destes fármacos durante a adolescência. A vareniclina, fármaco agonista parcial dos receptores colinérgicos nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ e total dos $\alpha 7$, é um dos medicamentos aprovados para o tratamento do transtorno por uso de substâncias associado à nicotina destinado a adultos. No presente estudo, esta substância foi utilizada no tratamento de um modelo animal de exposição à fumaça do cigarro durante a adolescência com o objetivo de avaliar seus efeitos sobre parâmetros neuroquímicos. Do dia pós-natal 30 (PN30) ao 45, 93 camundongos Suíços (ambos os sexos) foram expostos à fumaça de cigarro (0,73 mg de nicotina; FUM) ou ao ar (AR) por 8 h/dia em equipamento de exposição automatizado. Em PN41, foi iniciado o tratamento com vareniclina (0,5 mg/kg/bid v.o.; VAR) ou água (AG); de PN46 a PN56, a dose foi dobrada. Uma parte dos animais foi eutanasiada em PN41 (antes do tratamento com vareniclina) e outra em PN56 (após o tratamento). A exposição crônica à fumaça de cigarro durante onze dias (PN41) não afetou os níveis das subunidades alfa-4, alfa-7 e beta-2 de receptores colinérgicos, e da enzima tirosina hidroxilase (TH) e da proteína transportadora de dopamina (DAT) no hipocampo de animais adolescentes. O tratamento com vareniclina durante quinze após exposição à fumaça aumentou os níveis da subunidade alfa-4, mas não de beta-2, no hipocampo de fêmeas adolescentes. A vareniclina promoveu a infrarregulação da subunidade alfa-7 no hipocampo de animais previamente expostos à fumaça de cigarro. A vareniclina não afetou os níveis de TH no hipocampo de nenhum dos grupos experimentais, mesmo após quinze dias de tratamento. O tratamento com vareniclina atenuou os níveis de DAT no hipocampo em ambos os sexos. A exposição à fumaça de cigarro e o tratamento com vareniclina alterou os níveis de DAT no hipocampo de machos, mas não de fêmeas. Nossos resultados indicam que, embora o uso da vareniclina seja seguro, este fármaco tem efeito sexo-dependente sob a circuitaria neuroquímica da dopamina em animais adolescentes. Estes achados indicam que o estudo dos efeitos do uso de vareniclina no tratamento de adolescentes fumantes deve ser aprofundado.

Palavras-chave: Cigarro. Vareniclina. Adolescência. Desenvolvimento. Neuroquímica.

ABSTRACT

BRAGA, Fernanda Uchoa. *Neurochemical effects on the cholinergic and dopaminergic system of varenicline use in an animal model of cigarette smoke exposure during adolescence*. 2022. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Smoking is currently considered the leading cause of preventable death in the world. Although several countries are showing a significant drop in the number of users, the use of tobacco products is still a major public health problem worldwide. Nicotine is the main substance present in tobacco leaves, being widely identified as responsible for the development of dependence. Unfortunately, the habit of smoking starts during adolescence for most users, and this is one of the reasons pointed out as responsible for chronic use throughout adulthood, generating numerous long-term damages. However, pharmacotherapeutic approaches are initiated only in adulthood due to the scarcity of information about the effects of using these drugs during adolescence. Varenicline, a partial agonist drug of $\alpha 4\beta 2$ and total of $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptors, is one of the drugs approved for the treatment of nicotine-associated substance use disorder for adults. In the present study, this substance was used in the treatment of an animal model of exposure to cigarette smoke during adolescence with the objective of evaluating its effects on neurochemical parameters. From postnatal day 30 (PN30) to 45, 93 Swiss mice (both sexes) were exposed to cigarette smoke (0.73 mg nicotine; FUM) or air (AR) for 8 h/day in automated exposure. In PN41, treatment with varenicline (0.5 mg/kg/bid p.o.; VAR) or water (AG) was started; from PN46 to PN56, the dose was doubled. One part of the animals was euthanized at PN41 (before treatment with varenicline) and the other at PN56 (after treatment). Chronic exposure to cigarette smoke for eleven days (PN41) did not affect the levels of alfa-4, alfa-7 and beta-2 subunits of cholinergic receptors, and the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine transporter protein (DAT) in the hippocampus of adolescent animals. Treatment with varenicline for fifteen days after exposure to smoke increased levels of the alfa-4 subunit, but not beta-2, in the hippocampus of adolescent females. Varenicline down-regulated the alfa-7 subunit in the hippocampus of animals previously exposed to cigarette smoke. Varenicline did not affect TH levels in the hippocampus of any of the experimental groups, even after fifteen days of treatment. Treatment with varenicline attenuated DAT levels in the hippocampus in both sexes. Exposure to cigarette smoke and treatment with varenicline altered DAT levels in the hippocampus of males but not females. Our results indicate that, although the use of varenicline is safe, this drug has a sex-dependent effect on the dopamine neurochemical circuitry in adolescent animals. These findings indicate that the study of the effects of the use of varenicline in the treatment of adolescent smokers should be deepened.

Keywords: Cigarette. Varenicline. Adolescence. Development. Neurochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Nicotiana Tabacum	15
Figura 2 –	Brasão das Armas Nacionais	18
Figura 3 –	Vias dopaminérgicas	25
Figura 4 –	Linha do tempo	34
Figura 5 –	Máquina de produção automática de fumaça de cigarro, Teague Enterprises (E.U.A.)	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Dados referentes à subunidade alfa-7 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)	40
Gráfico 2 –	Dados referentes à subunidade alfa-4 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)	41
Gráfico 3 –	Dados referentes à subunidade beta-2 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)	42
Gráfico 4 –	Dados referentes à enzima tirosina hidroxilase no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)	43
Gráfico 5 –	Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 55 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)	44
Gráfico 6 –	Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 80 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)	45
Gráfico 7 –	Dados referentes à subunidade alfa-7 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento	47
Gráfico 8 –	Dados referentes à subunidade alfa-7 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição, tratamento e sexo	48
Gráfico 9 –	Dados referentes à subunidade alfa-4 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento	49
Gráfico 10 –	Dados referentes à subunidade alfa-4 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição, tratamento e sexo	49

Gráfico 11 –	Dados referentes à subunidade beta-2 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento	50
Gráfico 12 –	Dados referentes à enzima tirosina hidroxilase no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento	51
Gráfico 13 –	Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 55 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento	53
Gráfico 14 –	Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 55 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição, tratamento e sexo	53
Gráfico 15 –	Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 80 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento	55
Gráfico 16 –	Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 80 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição, tratamento e sexo	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resultados das uANOVAs globais para os dados dos marcadores no hipocampo de camundongos Suíços em PN41	39
Tabela 2 –	Resultados das uANOVAs globais para os dados de alfa-7 em PN56	46
Tabela 3 –	Resultados das uANOVAs globais para os dados de alfa-4 em PN56	48
Tabela 4 –	Resultados das uANOVAs globais para os dados de beta-2 em PN56	50
Tabela 5 –	Resultados das uANOVAs globais para os dados de TH em PN56	51
Tabela 6 –	Resultados das uANOVAs globais para os dados de DAT 55 kDa em PN56	52
Tabela 7 –	Resultados das uANOVAs globais para os dados de DAT 80 kDa em PN56	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
ANOVA _r	Análise de Variância de repetição
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
ChAT	Acetiltransferase
DAT	Transportador de Dopamina
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
FDA	Food and Drug Administration
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
KTRDC	Kentucky Tobacco Research & Development Center
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PN	Dia Pós Natal
SNC	Sistema Nervoso Central
uANOVA	Análise de Variância Univariada
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VAR	Vareniclina
VTA	Área tegmental ventral
TRN	Terapia de Reposição de Nicotina
L-DOPA	Ácido (S)-2-amino-3-(3,4- <i>hidroxifenil</i>) propanóico
TH	Tirosina Hidroxilase
CPF	Córtex pré-frontal
NMDA	N-metil D-Aspartato
SN	Substância Negra
NAc	Núcleo Accubens
BHE	Barreira hematoencefálica
FUM	Fumaça
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay

LISTA DE SÍMBOLOS

kg	quilograma
mg	miligrama
g	grama
μL	microlitro
mm	milímetro
>	maior que
<	menor que
\pm	mais ou menos
α	alfa
β	beta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Tabagismo	17
1.2	Tabagismo na adolescência	21
1.3	Desenvolvimento do SNC e o sistema dopaminérgico	23
1.4	Nicotina e a dependência	26
1.5	Tratamento para o tabagismo: o uso da vareniclina	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Animais	33
3.2	Grupos experimentais	33
3.3	Período de habituação e exposição à fumaça de cigarro	35
3.4	Período de tratamento com vareniclina	36
3.5	Coleta de tecidos	37
3.6	Análise da expressão de proteínas por Western blotting	37
4	RESULTADOS	39
4.1	PN41	39
4.1.1	<u>Alfa-7</u>	40
4.1.2	<u>Alfa-4</u>	41
4.1.3	<u>Beta-2</u>	42
4.1.4	<u>TH</u>	43
4.1.5	<u>DAT</u>	44
4.1.5.1	55 kDa	44
4.1.5.2	80 kDa	45
4.2	PN56	46
4.2.1	<u>Alfa-7</u>	46
4.2.2	<u>Alfa-4</u>	48
4.2.3	<u>Beta-2</u>	50

4.2.4	<u>TH</u>	51
4.2.5	DAT 55 kDa	52
4.2.6	DAT 80 kDa	54
5	DISCUSSÃO	56
5.1	PN41	56
5.1.1	<u>Efeitos da exposição sob os nAChR dos subtipos alfa-4, beta-2 e alfa-7</u>	56
5.1.2	<u>Efeitos da exposição sob TH</u>	57
5.1.3	<u>Efeitos da exposição sob DAT</u>	58
5.2	PN56	59
5.2.1	<u>Efeitos sob as subunidades alfa-4 e beta-2</u>	59
5.2.2	<u>Efeitos sob a subunidade alfa-7</u>	60
5.2.3	<u>Efeitos sob DAT e TH</u>	62
	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

INTRODUÇÃO

As plantas do gênero *Nicotiana* L. pertencem à família Solanaceae e mais de 70 espécies já foram identificadas. Entre elas destaca-se a espécie *Nicotiana Tabacum* (figura 1), sendo esta a mais utilizada para produção industrial de tabaco em todo o mundo devido ao seu alto teor do alcalóide nicotina (1-3%) (BUCHANAN, 1994; KISHORE, K. 2014). A *Nicotiana Rustica* também tem destaque devido ao alto teor de nicotina (até 9%), porém, além de também ser utilizada para produção de cigarros, essa espécie costuma ser abundantemente utilizada como inseticida para controle de pragas em plantações (MOREIRA, 2007; BUCHANAN, 1994). É relatado que os termos “tabacum” e “tabaco” surgiram a partir de um tipo de junco vazado que era utilizado pelos indígenas para inalação da fumaça (OLIVEIRA, *et al.*, 2012), fazendo com que as plantas desse gênero fossem chamadas popularmente como “tabaco” até os dias atuais.

Figura 1 - *Nicotiana Tabacum*



Fonte: https://onszaden.com/nicotiana_tabacum#

As plantas do gênero *Nicotiana* foram descobertas pelos Europeus em 1492 enquanto Cristóvão Colombo e outros viajantes exploravam, pela primeira vez na história, o continente americano (BENZONI, 2021). Ao chegarem às Antilhas, Colombo e seus homens foram recebidos por índios Aruaques (COLOMBO, 1492; RUBIO MONTEVERDE; RUBIO MAGAÑA, 2006) que possuíam uma vasta diversidade de especiarias nunca antes vistas pelo

Velho Mundo. Entre elas, a que mais chamou atenção dos europeus foram folhas de plantas do gênero *Nicotiana*, já que tais índios possuíam o hábito de utilizá-las de diversas formas, sempre com finalidades medicinais e religiosas (APPERSON, 1914; SANTOS; BRACHT; CONCEIÇÃO, 2013). Era comum observá-los inalando a fumaça gerada pela queima das plantas, bem como cheirando o pó, mascando ou ingerindo-as em forma de chá (VALLE *et al.*, 2007; GOODMAN *et al.*, 2005; LONGENECKER, 2002). Apesar de este hábito ter sido considerado novidade pelos europeus, é sabido que tal prática acontece em tribos indígenas há aproximadamente 2 mil anos (GATELY, 2003). Os termos “*Nicotiana*” e “*nicotina*” originaram-se a partir de uma homenagem ao diplomata e intelectual francês Jean Nicot (APPERSON, 1914), pois foi constatado que, em 1560, Nicot enviara folhas deste gênero para a então rainha da França Catarina de Médicis, recomendando que a mesma as utilizasse com a finalidade de tratar fortes dores de cabeça (LONGENECKER, 2002; RODGMAN; PERFETTI, 2009; MICHELI, 2015). A partir do uso pela rainha, tal planta começou a ganhar notoriedade, se espalhando por toda a Europa em forma rapé ou fumo (MOUTINHO; NUNES, 2008; SINDITABACO, 2021) e, em seguida, se espalhou pelo resto do mundo (BROOKS, 1953; CORNEILLE, 1964).

Apenas no final do século XVII, os primeiros relatos relacionando o tabaco à enfermidades como o câncer começaram a surgir (HILL, 1761; VON SOEMMERRING, 1975; KATCHER, 1993) e, apesar do borburinho envolvendo os malefícios do uso da planta, a revolução industrial no século XVIII acabou culminando no aumento da produção de tabaco (APPERSON, 1914). Nesta época, os produtos mais consumidos pela nobreza eram os cachimbos, que reinaram até o século XIX, enquanto a classe menos favorecida pegava as pontas de charutos jogados na rua, picavam-as e as enrolavam em papeletes, surgindo, então, os primeiros cigarros (ENCYCLOPÉDIE DU TABAC, 1977; ROSEMBERG, 2002). Após a Primeira Guerra Mundial, os cigarros começaram a ser produzidos em massa por serem mais econômicos e fáceis de transportar (GLANTZ *et al.*, 1998; ROSEMBERG, 2002).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Tabagismo

O tabagismo é uma doença crônica, causada pela dependência à nicotina presente nas folhas de tabaco (INCA, 2021a), que atualmente integra o grupo de "transtornos mentais, comportamentais ou do neurodesenvolvimento" segundo a Revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde [CID-11] (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Segundo o último relatório da World Health Organization sobre a epidemia global do tabaco (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019), o tabagismo é considerado como a principal causa de morte evitável no mundo, sendo, nos dias atuais, responsável pela morte de mais de 8 milhões de pessoas por ano, incluindo 1,2 milhões de pessoas expostas ao fumo passivo (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2021). Existem diversos fatores que podem induzir ao hábito de fumar, tais como transtornos psiquiátricos (DUTRA-TAVARES *et al.*, 2021), fatores psicossociais, genéticos e culturais (RONDINA, 2003; RONDINA, 2007; SILVA, 2016). Mais de 80% dos 1,3 bilhões de usuários de tabaco no mundo se encontram em países de baixa e média renda, onde o peso das doenças e mortes relacionadas ao tabaco é maior devido à falta de acesso à saúde pública de qualidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

No Brasil, devido ao tabagismo, morrem mais de 150 mil pessoas por ano, o que significa em torno de 430 pessoas por dia, representando 12,6% das causas de morte no país (ALIANÇA DE CONTROLE DO TABAGISMO, 2021). Cerca de 80% das pessoas começam a fumar diariamente antes dos 19 anos, sendo 20% com menos de 15 anos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019). Felizmente, o número de fumantes adultos vem apresentado uma expressiva diminuição nas últimas décadas graças às ações desenvolvidas pela Política Nacional de Controle do Tabaco. Segundos os dados apresentados pela Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (PNSN), a população brasileira contava, em 1989, com 34,8% de fumantes, dado que contrasta com os 12,6% em 2019 relatados pela Pesquisa Nacional de Saúde (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2021b). Também em 2019, em um estudo realizado em 26 estados e no Distrito Federal pela Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, foi demonstrado que, no Brasil, a frequência de adultos fumantes no sexo masculino (12,3%) é maior do que no feminino (7,7%) (VIGITEL, 2020).

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations, de 1993 até 2013, o Brasil ocupou o primeiro lugar entre os cinco maiores exportadores mundiais de tabaco (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2021). A exportação de tabaco já se apresentava economicamente expressiva desde o século XIX, de forma que o Brasão de Armas Nacionais do Brasil foi ornamentado, à direita, por um ramo de fumo florido e, à esquerda, por um ramo de café (figura 2), permanecendo desta forma até os dias atuais. Diante dos inúmeros malefícios do uso do tabaco relatados na literatura, o deputado Zé Silva criou, em 2013, um projeto de lei (PL 4929/13) afim de substituir a folha de tabaco ilustrado no Brasão por um ramo de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam), porém, nada foi alterado.

Figura 2 - Brasão das Armas Nacionais



Fonte: <https://www12.senado.leg.br/identidadevisual/armas-nacionais>

Hoje, é sabido que o cigarro contém mais de 7 mil substâncias químicas, sendo centenas destas tóxicas, e, aproximadamente, 70 cancerígenas (WÜNSCH FILHO *et al.*, 2010; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018; AMERICAN LUNG ASSOCIATION, 2020). O processo de produção industrial do tabaco fornece ao cigarro substâncias que são extremamente nocivas à saúde, como o alcatrão, cianeto de hidrogênio, formaldeído, nitrosamina e benzeno (TRIGO, 2007). Além do câncer, outras doenças crônicas não transmissíveis também são atribuídas ao tabagismo, como osteoporose, impotência sexual no homem, infertilidade na mulher e doença

pulmonar obstrutiva crônica (MELLO *et al.*, 2001; HORTENSE, 2008; WÜNSCH FILHO *et al.*, 2010; SILVA, 2016; INCA, 2021a).

Apesar de o cigarro tradicional ser a forma mais comum de uso do tabaco, este pode ser utilizado de diversas outras formas, como o charuto, cachimbo, narguilé e formas que não utilizam da queima, como o tabaco mascado e o snuff (absorção pelas mucosas) (VIEGAS, 2008). Infelizmente, os adolescentes estão utilizando diferentes produtos à base de tabaco afim de fugir do cigarro convencional, mesmo que estes ainda contenham nicotina, o que pode gerar o risco do desenvolvimento de dependência ao longo da vida (CDC, 2020). A forma mais recente de uso do tabaco, em especial de uso da nicotina, é o cigarro eletrônico (CE). Estes dispositivos funcionam através de um sistema de aquecimento que vaporiza uma solução líquida contendo diversas substâncias químicas, como a nicotina, derivados de cannabis, glicina e até mesmo metais pesados, como ferro e chumbo. O aerossol gerado pela vaporização dessas substâncias é inalado pelos usuários (SALES *et al.*, 2021). Patentado em 2003 pelo farmacêutico chinês Hon Lik, o CE surgiu como uma forma de terapia de reposição de nicotina durante o tratamento contra o tabagismo (CAHN *et al.*, 2011), mas ganhou popularidade ao redor do mundo como uma forma “mais segura” de fumo por conter menos substâncias químicas em relação aos cigarros tradicionais e por não possuir queima, sendo vistos como potencialmente menos nocivos à saúde humana (NUTT, *et al.*, 2014; POLOSA, 2015; DARVILLE & HAHN *et al.*, 2019). Entretanto, com o crescente número de usuários e de pesquisas envolvendo os CEs, um novo panorama acerca destes dispositivos vem sendo apresentado na literatura. Independente da presença da nicotina, os CEs podem provocar lesões pulmonares, desequilíbrio da microbiota intestinal, ativação de processos inflamatórios, alterações cardiovasculares, entre outros (RALHO *et al.*, 2019). Com isso, muitos estudos ainda estão sendo realizados para entender os efeitos destes dispositivos.

Com o aumento no número de enfermidades e mortes causadas pelo tabagismo ao longo dos anos, algumas estratégias de prevenção foram desenvolvidas no intuito de cessar a epidemia de uso do tabaco, como o aumento no preço de produtos contendo tabaco e até a proibição da venda e propaganda em alguns países (MCDANIEL, *et al.*, 2016). Em 2017, a US Food and Drug Administration (FDA) propôs diminuir a quantidade de nicotina dos cigarros convencionais com o objetivo de retardar ou até frear o processo de adição (GOTTLIEB *et al.*, 2017). Apesar de a proposta ter potencial para salvar milhares de vidas, esta não foi implementada devido à percepção errônea da população sobre a atuação da nicotina. Curiosamente, como mostra um estudo de 2018 realizado nos Estados Unidos, 80% da população adulta acredita que a nicotina seja a única causa das doenças relacionadas ao

cigarro (MUMFORD *et al.*, 2018). Apesar de a nicotina ser a principal substância psicoativa presente no tabaco e ser a responsável pelo processo de dependência (STOLERMAN & JARVIS, 1995; BENEWITZ, 2010), muitos fumantes acreditam que cigarros contendo nicotina reduzida são menos prejudiciais à saúde e optam por continuar fumando, ao invés de cessar o uso. Em longo prazo, costumam mostrar arrependimento em ter começado a fumar, entretanto sentem dificuldade em parar (JARVIS *et al.*, 2002; AVEYARD & WEST *et al.*, 2007) devido aos sintomas da abstinência, que incluem desejo intenso de fumar, irritabilidade, dificuldade de concentração, anedonia e ansiedade (PIPER, 2015). Apesar disso, a maioria dos fumantes não reconhecem que estão em um processo de dependência, mesmo que fumem há anos, rotulando o uso de nicotina como um hábito (ROTHWELL & LAMARQUE, 2011) e achando que conseguem controlar o uso e até interrompê-lo quando desejarem (AMOS *et al.*, 2006; BANCROFT *et al.*, 2003).

O primeiro tratado internacional de combate ao tabagismo criado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) foi a Convenção-Quadro para o controle do tabagismo (CQCT). Nessa convenção, 180 países alcançaram suas metas e criaram suas próprias políticas e leis (SILVA *et al.*, 2016). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) é o órgão do Ministério da Saúde (MS) responsável pelo Programa Nacional de Controle do Tabagismo (PNCT), que está incluído na Política Nacional de Controle do Tabagismo e é orientado a cumprir as medidas da Convenção-Quadro, que articula a rede de tratamento do tabagismo no Sistema Único de Saúde (SUS) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

Com isso, formas de tratamento foram e estão sendo amplamente estudadas e adotadas com o intuito de cessar o tabagismo, tais como a terapia cognitivo comportamental (TCC), a terapia de reposição de nicotina (TRN), a bupropiona e a vareniclina (GUO *et al.*, 2022). Cada uma das intervenções terapêuticas podem ser efetivas quando utilizadas de forma individual, contudo, quando utilizadas de forma combinada, se mostram ainda mais efetivas pois funcionam de forma complementar (PATNODE *et al.*, 2021; HARTMANN-BOYCE *et al.*, 2019; STEAD *et al.*, 2016). Atualmente no Brasil, de acordo com a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC) no SUS, a TRN (através de adesivo transdérmico ou goma de mascar ou pastilha) e o Cloridrato de Bupropiona são considerados de primeira linha para tratamento da dependência à nicotina; a vareniclina não foi implementada por baixo custo-benefício em comparação ao tratamento de TRN+Bupropiona (BRASIL, 2016; BRASIL, 2019). Todavia, o uso da vareniclina tem sido apontado na literatura como abordagem farmacológica de maior eficácia contra o tabagismo (CAHILL *et al.*, 2013),

principalmente em conjunto a TRN (CHANG, *et al.*, 2015) ou bupropiona (GUO *et al.*, 2022). Os estudos em relação aos efeitos destes fármacos estão em ascensão.

Interessantemente, homens e mulheres podem apresentar comportamentos diferentes em relação ao uso do cigarro. Em um estudo de 2007, foi demonstrado que mulheres tendem a fumar menos cigarros por dia em comparação aos homens e mostram tendência a escolher os cigarros com menos nicotina. Além disso, inalam a fumaça menos profundamente que os homens (MELIKIAN *et al.*, 2007). As mulheres também demonstram maior estresse e ansiedade como sintomas de abstinência em comparação aos homens (TORRES & O'DELL, 2016). Além do fator sexo, a idade em que se inicia o uso da nicotina parece influenciar na intensidade da dependência pela droga. Quanto menor a idade de início do uso, maior a chance de desenvolver dependência à nicotina ao longo da vida adulta (TAIOLI & WYNDER, 1991; KANDEL & CHEN, 2000). Apesar disso, os tratamentos farmacológicos contra o tabagismo ainda são recomendados somente para adultos devido à falta de evidências científicas quanto aos efeitos desses medicamentos no organismo dos adolescentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; STEAD *et al.*, 2008), com isso o tratamento acaba sendo iniciado tardiamente durante a vida adulta e a reversão pode ser prejudicada.

1.2 Tabagismo na adolescência

O tabagismo é considerado uma doença pediátrica, pois, mundialmente, 80% dos fumantes começam antes dos 18 anos (SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION, 2014; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2014). No Brasil, 20% iniciam o hábito antes dos 15 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019). A OMS (1965) define a adolescência como a etapa que compreende a segunda década da vida (dos 10 aos 20 anos), já o Estatuto da Criança e do Adolescente (BRASIL, 2019) considera que esta etapa ocorra dos 12 aos 18 anos.

Impulsividade, comportamento de risco, busca por novidade e uso de drogas são comportamentos característicos dos jovens (BAVA *et al.*, 2010). De fato, a maior parte dos fumantes de longo prazo relata ter iniciado o hábito durante a adolescência (PIERCE *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1998; JEFFERIS *et al.*, 2003; O'LOUGHLIN *et al.*, 2013; ROBERTS *et al.*, 2015). No geral, trata-se de um período crítico, pois os jovens vivenciam diversas mudanças nos aspectos neurológico (CASEY *et al.*, 2008; BLAKEMORE, 2012;

DUMONTHEIL, 2016; FOULKES, 2018), hormonal (EDWARD *et al.*, 1975; GODDINGS *et al.*, 2019) psicológico (STEINBERG, 2004; ROMEO & MCEWEN, 2016; JAI *et al.*, 2016), social (BURNETT & BLAKEMORE, 2009; ORBEN *et al.*, 2020) e comportamental (ARY *et al.* 1999; DIAS *et al.*, 2010; ALBERT & STEINBERG, 2011). Apesar de o volume cerebral total atingir o pico no final da infância, a adolescência é marcada por mudanças cerebrais significantes em regiões específicas, mudanças na estrutura e funções que levam a padrões de comportamentos característicos apresentados por adolescentes. Em modelo animal, o consumo oral de nicotina (FERRIS *et al.*, 1998) e de álcool (ADRIANI *et al.*, 2002) em adolescentes é elevado.

O processo de desenvolvimento do tabagismo em adolescentes pode ser classificado em algumas etapas distintas. A etapa inicial é o primeiro contato com o tabaco, que pode acontecer ainda dentro de casa observando parentes fumantes e/ou na convivência de amigos da escola, assistindo pessoas famosas fumando em filmes, entre outras situações. Neste momento, o adolescente começa a modificar suas perspectivas em relação ao fumo, sentindo vontade de experimentar para sentir-se independente e pertencente aos grupos. Em seguida, a partir do primeiro uso, os jovens que vivenciam experiências minimamente positivas em relação ao fumo (o que acontece com a maioria) começam a aumentar lentamente o número de cigarros consumidos durante o mês, durante a semana e durante o dia, tornando-se usuários ativos e crônicos (LEVENTHAL & CLEARY, 1980; FLAY *et al.*, 1983; STERN *et al.*, 1987; ELDERS, 1997; LEONARDI-BEE *et al.*, 2011). Infelizmente, iniciar o hábito durante a adolescência pode resultar em uma dificuldade futura em parar de fumar, aumentando as chances do uso se prolongar para a vida adulta (EVERETT *et al.*, 1999; WILKINSON *et al.*, 2007; RICHMOND *et al.*, 2016; BRESLAU & PETERSON, 1996; CENGELLI *et al.*, 2012; CHEN, 1998; DIFRANZA & LEW, 1995; KANDEL & CHEN, 2000; KHUDER *et al.*, 1999). A longo prazo, o uso do tabaco se torna um escape dos sintomas de abstinência causados pela interrupção de uso da droga (McNEILL, 1991). Além disso, poucos cigarros são suficientes para desencadear sintomas de abstinência em adolescentes (DIFRANZA *et al.*, 2000) e o consumo diário é maior em indivíduos que iniciaram o hábito ainda durante a adolescência, em comparação aos que iniciaram mais tardiamente (CHEN & MILLAR, 1998; Nelson *et al.*, 1995; PIERCE & GILPIN, 1996).

A alta neuroplasticidade nesta fase da vida é de extrema importância para o desenvolvimento de novas habilidades, alta capacidade para absorver informações, aprender novas tarefas e aprimorar talentos, portanto o uso de substâncias psicoativas nesta fase da vida pode ser extremamente nocivo tendo em vista que o cérebro humano se encontra ainda em

desenvolvimento (BODISON *et al.*, 2020). Apesar de o volume cerebral total atingir o pico no final da infância, a adolescência é marcada por mudanças cerebrais significantes em regiões específicas, mudanças na estrutura e funções que levam a padrões de comportamentos característicos apresentados por adolescentes (DUMONTHEIL, 2016).

Em camundongos (modelo experimental do presente estudo) e ratos, a adolescência compreende o período que vai do 28º ao 60º dia de vida pós-natal (PN) (SPEAR, 2000). Roedores também apresentam traços comportamentais característicos da adolescência, tais como: elevados níveis de busca pela novidade (ADRIANI *et al.*, 1998), impulsividade (ADRIANI & LAVIOLA, 2003) e comportamento de risco (MACRI *et al.*, 2002), assim como redução de resposta ao estresse (ADRIANI & LAVIOLA, 2000).

1.3 **Desenvolvimento do SNC e o sistema dopaminérgico**

A maior vulnerabilidade dos adolescentes às drogas de abuso e outros comportamentos de risco está relacionada, além do contexto social, à forma em que o cérebro se modifica ao longo desta etapa da vida (CASEY, *et al.*, 2008). É sabido que o desenvolvimento do cérebro humano tem seu início na vida intrauterina, passando por toda a infância, adolescência e até a idade adulta jovem (BODISON *et al.*, 2020). Estudos com animais e humanos indicam que a puberdade, por exemplo, pode exercer grande influência na maturação neural (CAHILL, 2006). O aumento na produção de estrogênio e testosterona que ocorre durante a puberdade molda as percepções e comportamentos dos jovens, que podem se consolidar durante a vida adulta. (SISK & FOSTER, 2004; SPEAR, 2000; SATO *et al.*, 2008). Estudos com ressonância magnética estrutural (RME) indicam que, durante a puberdade, um aumento na amígdala dos homens é observado enquanto que, nas mulheres, é observado um aumento no volume dos hipocampos, indicando dimorfismo sexual gerado pelos diferentes níveis hormonais produzidos nesta fase da vida (LENROOT *et al.*, 2007; NEUFANG *et al.*, 2009). Experimentos com animais indicam que as mudanças hormonais exercem importantes e profundas mudanças na maturação neural (CAHILL, 2006; SISK AN FOSTER, 2004; SPEAR, 2000).

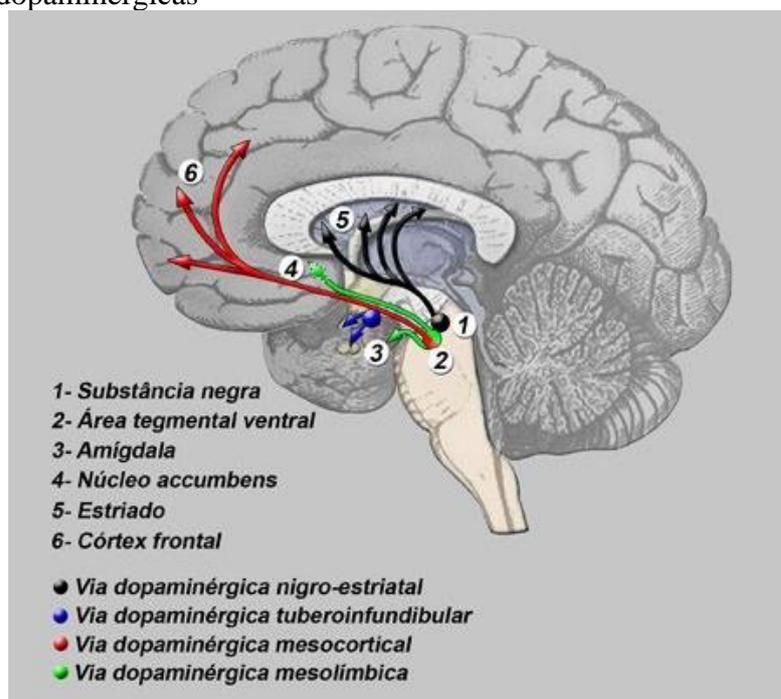
É indicado na literatura que os padrões de integração entre a área frontal e límbica cerebral adolescente se diferencia dos adultos e das crianças (FARERI *et al.*, 2008; GALVAN *et al.*, 2006). Foi possível observar através de RME que o volume de substância branca

cerebral aumenta linearmente durante as primeiras três décadas de vida, enquanto o volume de substância cinzenta apresenta seu pico no final da infância, seguido da queda ao longo da adolescência (LEBEL & BEAULIEU, 2011; BLAKEMORE, 2012). Embora o pico de produção de tubulina, axônios e sinapses ocorra nos primeiros dias pós-natal, a produção de mielina permanece em plena atividade no lobo frontal do cérebro adolescente (GIEDD *et al.*, 2004), o que implica nos processos cognitivos. A redução do volume de substância cinzenta cerebral está relacionada a um processo natural chamado “poda sináptica” (DRZEWIECKI *et al.*, 2020; BRENHOUSE *et al.*, 2011), onde as conexões neurais menos utilizadas são eliminadas, enquanto o aumento da substância branca está relacionada ao processo de mielinização dos neurônios mais utilizados (TAU *et al.*, 2010). A maturação não ocorre de forma homogênea em todo o cérebro. É discutido na literatura que filogeneticamente as regiões cerebrais mais antigas amadurecem mais rápido que as mais recentes (GOGTAY *et al.*, 2004), de forma que a área límbica (responsável pelo processamento de emoções e memórias) amadurece antes do córtex pré-frontal (região relacionada ao controle de impulsos) (GOGTAY *et al.*, 2004; CASEY, 2008; GALVAN, 2010), o que pode explicar o comportamento impulsivo, intenso e inconsequente dos jovens (DAHL, 2004; STEINBERG, 2004). As modificações estruturais das substâncias cinzenta e branca que envolve a poda sináptica e a mielinização são essenciais para a maturação de redes neurais específicas que se tornam especializadas e fortalecidas (ou descartadas) conforme a adolescência avança. A transmissão dopaminérgica para o córtex pré-frontal (CPF) é de extrema importância para o funcionamento deste, incluindo processos como a memória de trabalho, raciocínio, atenção, controle inibitório e regulação de risco e recompensa (LUNA, *et al.*, 2015; FLORESCO, 2013).

Um importante sistema neural que passa por remodelação nesta fase da vida é o sistema dopaminérgico meso-corticolímbico (figura 3), que possui como neurotransmissor a dopamina, uma catecolamina sintetizada em neurônios dopaminérgicos a partir da conversão da tirosina para L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) pela enzima tirosina hidroxilase (TH). A L-DOPA, então, é descarboxilada pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (DOPA decarboxilase) em dopamina, a qual é armazenada em vesículas até ser liberada na fenda sináptica (FELDMAN *et al.*, 1997) e posteriormente recaptada para dentro da célula pelo transportador de dopamina (DAT). A expressão de DAT é exclusiva para neurônios dopaminérgicos, com isso é utilizado como marcador para identificação deste tipo especializado de neurônio (CILIAUX *et al.*, 1995; FREED *et al.*, 1995). Os neurônios dopaminérgicos também se diferenciam dos outros produtores de catecolaminas pela ausência

da enzima dopamina beta-hidroxilase, uma vez que esta converte a dopamina em noradrenalina (HOKFELT, 1976; FELDMAN *et al.*, 1997). É sabido que durante a adolescência, a resposta dos receptores de dopamina dos tipos D1 e D2 no núcleo accubens ainda estão imaturas, o que prejudica a transmissão sináptica para o CPF (BENOIT-MARAND & O'DONNELL, 2008). A ativação do receptor D2 de interneurônios de disparo rápido do CPF surge apenas no final da adolescência, a partir do recrutamento e maturação da atividade GABAérgica local (TSENG & O'DONNELL, 2007; O'DONNELL, 2010). Além disso, importantes interações entre o N-metil D-Aspartato (NMDA) com os receptores D2 em neurônios piramidais corticais ainda se encontram em desenvolvimento, interações estas essenciais para o processamento cognitivo e atencional (TSENG & O'DONNELL, 2005). A sinalização do hipocampo para o CPF medial ocorre apenas ao final da adolescência, com o surgimento funcional da subunidade GluN2B do receptor NMDA mediado pelo receptor D1 (FLORES-BARRERA *et al.*, 2014).

Figura 3 - Vias dopaminérgicas



Fonte: <http://oneurotransmissor.blogspot.com/2013/05/patologias-causas-esquizofrenia.htmls>

A liberação de dopamina ocorre através de duas importantes vias neurais que se iniciam no mesencéfalo. A primeira via se origina na substância negra (SN) cerebral e possui inervações que liberam dopamina nos estriados dorsal e ventral e está associada ao controle motor, enquanto a segunda via se origina na área tegmental ventral (VTA) e se projeta para estruturas límbicas como o núcleo accubens (NAc), amígdala, hipocampo e córtex pré frontal

medial, sendo chamada de “via de recompensa cerebral” e relacionada à regulação das emoções e memórias (MOORE & BLOOM, 1979; OADES AND HALLIDAY, 1987; SIMON *et al.*, 1980; BJORKLUND & DUNNETT, 2007; DAHLSTROM *et al.*, 1964). Os neurônios pré sinápticos dopaminérgicos presentes tanto no VTA quanto na SN possuem, em suas membranas, os receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs), que podem ser ativados quando o neurotransmissor acetilcolina (ACh) se conecta a eles, gerando um potencial de ação dentro da célula que promove, assim, a liberação de dopamina na via (LITTLE, 2000; BERRETINI & LERMAN, 2005; GONZÁLEZ-GARRIDO, 2005). A perturbação deste sistema durante a adolescência por uso de drogas está relacionada a problemas de saúde de longo prazo, como a esquizofrenia e doença de Parkinson (YANG *et al.*, 2003; LEWIS *et al.*, 1992; IVERSEN, 2007). Todas as drogas de abuso possuem como característica em comum, mesmo que de formas diferentes, a capacidade de exercer efeitos sob o sistema mesolímbico (BALFOUR, 2009; WISE, 2004; VOLKOW *et al.*, 2004; DI CHIARA *et al.*, 2004; KOOB & LE MOAL 2001; NESTLER, 2001; DI CHIARA & IMPERATO, 1988). O tabagismo, em especial, exerce grande influência sob este sistema, principalmente durante a adolescência, devido à presença da nicotina, um alcalóide presente na fumaça de cigarro que desempenha um importante papel no desenvolvimento da dependência (BENOWITZ, 2009; DANI & HEINEMANN, 1996; MANSVELDER & MCGEHEE, 2002) ao mimetizar os efeitos da ACh, provocando efeitos danosos duradouros nos âmbitos cognitivo e comportamental na vida adulta que serão apresentados no tópico a seguir.

1.4 Nicotina e a dependência

A nicotina foi isolada das folhas de tabaco pela primeira vez em seu estado puro por Posselt e Reiman em 1828 (GOODMAN & GILMAN, 2005), dando início aos estudos farmacológicos desta substância. Ela pode ser absorvida na pele, mucosa oral, no intestino e nos pulmões, porém o nível de absorção depende do pH do meio, já que, quanto maior o pH, mais facilmente a nicotina penetra nas membranas biológicas (LANGONE *et al.*, 1973; MISHRA *et al.*, 2015). Como o cigarro tem o pH ácido, a nicotina se encontra na forma ionizada, logo, não é absorvida pelas mucosas, porém, ao atingir os pulmões, ela encontra um muco alcalino presente entre os alvéolos e bronquíolos, podendo, assim, ser dissolvida e rapidamente absorvida em sua forma molecular (TUTKA *et al.*, 2005). Aproximadamente

35% da nicotina é destruída no momento da combustão do cigarro, mais 35% são perdidos com a fumaça não-inhalada e 8% com a porção não-fumada (CARMO, 2002), logo, cada cigarro contém 7-9 mg de nicotina, dos quais pouco mais de 1 mg é absorvido pelo fumante (MARQUES *et al.*, 2001). Em humanos, a meia-vida da nicotina é de aproximadamente 2 horas (RANG *et al.*, 2004; HUKKANEN, 2005).

Em modelos animais, existem diversas vias de administração que proporcionam a exposição dos animais à nicotina com a finalidade de estudar seu impacto neuroquímico e comportamental, entre elas existe a auto-administração oral, onde os animais ingerem uma solução contendo nicotina (ADRIANI *et al.*, 2002; ABREU-VILLAÇA *et al.*, 2006; CLAUDIO-NETO., *et al* 2016; LOTUFO *et al.*, 2016 ; RIBEIRO-CARVALHO *et al.* 2009; RIBEIRO-CARVALHO *et al.*, 2008), injeções do tipo intravenosa (ROSEMBERG *et al.*, 1980) e intraperitoneal (ZARRINDAST *et al.*, 1996), minibomba osmótica (BARIK & WONNACOTT 2006; ROWELL & LI 1997; SANDERSON *et al.* 1993) e também através da inalação da fumaça de cigarros experimentais, afim de mimetizar o fumo ativo e/ou passivo. Uma das vantagens da administração da nicotina via fumaça de cigarro, além de ser a forma de absorção mais observada em humanos, é o fato de que o animal é exposto aos diversos outros componentes presentes no cigarro (COHEN & GEORGE, 2013), sendo a via de administração da nicotina abordada no presente estudo. Nosso laboratório conta com um amplo histórico de experimentos utilizando a exposição à fumaça de cigarro em diferentes períodos de desenvolvimento (ABREU-VILLAÇA *et al.*, 2013, 2015, 2019; SANTOS-SILVA *et al.*, 2011, 2013).

Ao ser inalada, a nicotina é rapidamente distribuída pelos tecidos do corpo, é metabolizada, principalmente pelo fígado, em torno de 1-2 horas (RANG & DALE, 2016) e atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) num intervalo de 10 a 19 segundos (HENNINGFIELD *et al.*, 1993). Ao atravessar a BHE e chegar ao SNC, a nicotina age sobre o sistema mesolímbico-dopaminérgico, onde atua ativando os nAChRs presentes em neurônios pré- e pós-sinápticos, principalmente, na área tegumental ventral (VTA) (ROSEMBERG, 2004). Estes receptores são canais iônicos estruturalmente pentaméricos, podendo ser formados por subunidades do tipo α ($\alpha 2 - \alpha 10$) ou β ($\beta 2 - \beta 4$) de forma homomérica ou heteromérica (HUCHO & CHANGEUX, 1973; DENERIS *et al.*, 1991; SARGENT, 1993; ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; LENA & CHANGEUX, 1998) que promovem não somente a liberação de dopamina, mas também de outros neurotransmissores, como acetilcolina, noradrenalina, serotonina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) (BENOWITZ, 2009, 2010). Estas subunidades (α e β) podem se organizar pentamericamente

em diversas combinações, formando receptores diferentes que irão desempenhar inúmeras funções essenciais para o funcionamento de processos fisiológicos e patológicos, o que inclui o desenvolvimento neuronal, aprendizado, ansiedade, memória e respostas de reforço induzidas por drogas de abuso (BERGINK, 2004; DANI *et al.*, 2007; DANI & BALFOUR, 2011; DWYER *et al.*, 2008). As combinações mais abundantes destas subunidades no SNC de mamíferos são as do tipo heteromérico $\alpha 4\beta 2$ e homomérico $\alpha 7$, que contam com alta afinidade para ACh e outros agonistas, incluindo a nicotina (CHANGEUX *et al.*, 1984; FLORES *et al.*, 1992).

De origem endógena, a ACh chega à ATV em uma concentração de aproximadamente 1 mM e é rapidamente hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) na fenda sináptica, o que promove a ativação dos nAChRs por um curto período de tempo. Diferentemente da ACh, a nicotina chega ao terminal pré sináptico da ATV de origem exógena em concentrações menores, aproximadamente 0.1 μ M, porém não é hidrolizada pela AChE, a deixando mais tempo na fenda e, conseqüentemente, promovendo um maior tempo de ativação dos nAChRs (GARRIDO *et al.*, 2001; KARLIN, 2002; WANG & SUN, 2005). Evidências experimentais indicam que a exposição dos nAChR à nicotina no ATV por um longo período de tempo é capaz de aumentar as taxas de dopamina no NAc (STOLERMAN & JARVIS, 1995; DANI & HEINEMANN, 1996; PICCIOTTO *et al.*, 1998; DI CHIARA, 2000; DANI & DE BIASI, 2001) e que lesões no VTA e no NAc atenuam significativamente a auto administração e os efeitos psicoestimulantes da nicotina (CLARKE *et al.* 1988; CORRIGALL *et al.* 1992, 1994). Também foi possível observar através do teste de preferência por lugar, que ratos administrados com citisina (um agonista dos nAChR), apresentaram preferência pelo compartimento que os fornecia citisina, diferente do grupo controle (MUSEO & WISE 1994), demonstrando os reforços positivos da ativação destes receptores.

É teorizado que a exposição crônica à nicotina nos nAChRs pode gerar dessensibilização destes receptores (BOYD, 1987), processo onde ocorre uma diminuição ou perda da resposta biológica devido ao excesso de ativação do receptor (LUKAS, 1991; MARKS *et al.*, 1993; PENG *et al.*, 1994; HSU *et al.*, 1996) cujo início é concentração-dependente (KARLIN, 2002; GARRIDO *et al.*, 2001). Além disso, é bastante discutido na literatura que a dessensibilização pode culminar na suprarregulação destes receptores, processo conhecido como uma resposta homeostática celular onde ocorre um aumento no número dos receptores (MARKS *et al.*, 1983; SCHWARTZ & KELLAR, 1985). Estes processos estão relacionados ao desenvolvimento de tolerância e sintomas de abstinência conseqüentes da exposição crônica à nicotina. Os subtipos de nAChR mais susceptíveis à este

processo são os tipo $\alpha 4\beta 2$, e $\alpha 7$ (ABREU-VILLAÇA *et al.*, 2004, 2003; BUISSON E BERTRAND, 2002). Em um estudo com animais realizado por Abreu-Villaça e colaboradores (Abreu-Villaça., 2003), foi demonstrado que a nicotina, mesmo que por um curto período e em baixa dosagem, é capaz de promover a suprarregulação dos nAChR. Em outros experientos realizados com ratos adolescentes e pré-adolescentes, foi possível observar a suprarregulação destes receptores ($\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$) no mesencéfalo, hipocampo e cortex (TRAUTH *et al.*, 1999; ABREU-VILLAÇA., 2003; DOURA *et al.*, 2008).

Como abordado no tópico 1.1, três tratamentos farmacológicos para cessação do uso da nicotina são comumente recomendados para adultos que são usuários crônicos. Um deles é a própria nicotina através da TRN, onde a nicotina é administrada via gomas de mascar, adesivos, inaladores e pastilhas (Raw *et al.*, 2002). Outro tratamento é a bupropiona, um fármaco utilizado originalmente para tratamento do Transtorno Depressivo Maior, que atua inibindo a recaptação de noradrenalina e de dopamina nas sinapses. Apesar da bupropiona ser amplamente prescrita para o tratamento do tabagismo em adultos, a vareniclina vem sendo apontada como um fármaco de maior potencial terapêutico quando comparada a bupropiona e TRN (EBBERT *et al.*, 2010; FOLDS, 2006; JORENBY *et al.*, 2006 HIND *et al.*, 2009). A literatura envolvendo os efeitos da vareniclina em adultos ainda está em pleno crescimento e seu uso já é observado ao redor do mundo, porém a literatura sobre os efeitos deste fármaco em adolescentes ainda é escassa. Com isso, o presente estudo utilizou a vareniclina como tratamento em camundongos adolescentes previamente expostos à fumaça de cigarro.

1.5 Tratamento para o tabagismo: o uso da vareniclina

A Vareniclina é uma substância química que foi sintetizada a partir da extração da citisina, um alcalóide que ocorre naturalmente na planta *Cytisus Laburnum* L. Esta planta era utilizada como substituta do tabaco durante a segunda guerra mundial por seus efeitos análogos. Em 2006, foi aprovada pelo FDA para tratamento do tabagismo (CAHILL *et al.*, 2013) e é, atualmente, apontada como terapia de primeira linha para tratamento do tabagismo por apresentar maior eficácia quando comparada a bupropiona e TRN. Estudos de metanálise, ensaios randomizados e revisões sistemáticas da literatura revelam que a vareniclina promove índices de abandono do tabagismo na ordem de 25-35% após um ano do início do tratamento (GONZALES *et al.*, 2006; JORENBY *et al.*, 2006). Atualmente é comercializada pela Pfizer

em mais de 90 países através do remédio Chantix® nos Estados Unidos e Champix® no Brasil e União Europeia (FAESSEL *et al.*, 2010; LEUNG *et al.*, 2011; ERWIN & SLATON, 2014). Recomenda-se que a dosagem para adultos comece em 0,5 mg uma vez por dia durante os primeiros 3 dias, seguida de 0,5 mg duas vezes por dia durante 4 dias e depois aumentada para 1 mg duas vezes por dia durante as 12 semanas seguintes (RIGOTTI, 2022). Em relação aos efeitos adversos, a literatura aponta sintomas leves, entre eles cabe destacar a presença de náusea, dores de cabeça e transtornos de sono, nenhum de caráter grave (GONZALES *et al.*, 2006; JORENBY *et al.*, 2006; ZWAR, 2014; FIORE *et al.*, 2008). A náusea ocasionada pela vareniclina costuma ocorrer, geralmente, no início do tratamento, sendo atenuada ao longo das semanas seguintes (JORENBY *et al.*, 2006). Em 2009, a FDA declarou um alerta sobre o uso da vareniclina em pacientes psiquiátricos associando o uso ao suicídio, porém, este risco foi refutado em 2016 por um ensaio randomizado, duplo-cego e controlado por placebo de alta escala envolvendo 16 países, que mostrou que os efeitos adversos neuropsiquiátricos devido ao uso da vareniclina não se diferem de outros tratamentos (ANTHENELLI *et al.*, 2016). O risco de problemas cardiovasculares também foi inicialmente associado ao uso da vareniclina e posteriormente refutado através de estudos aprofundados (PROCHASKA & HILTON, 2012). Em geral, a vareniclina é considerada segura e bem tolerada em adultos saudáveis de 18 aos 65 anos de idade. Entretanto, a literatura sobre a segurança e eficácia do uso por crianças e adolescentes com idade inferior aos 18 anos ainda não é bem estabelecida, portanto o uso da vareniclina ainda se limita à idade adulta (PFIZER, 2022). Como abordado anteriormente, a maioria dos usuários adultos que relatam ter iniciado o hábito durante a adolescência (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019), apresenta maior dificuldade de cessar o uso (EVERETT *et al.*, 1999; WILKINSON *et al.*, 2007; RICHMOND *et al.*, 2016; BRESLAU & PETERSON, 1996; CENGELLI *et al.*, 2012; CHEN and MILLAR, 1998; DIFRANZA & LEW, 1995; KANDEL & CHEN, 2000; KHUDER *et al.*, 1999). Com isso, os estudos acerca dos efeitos da vareniclina tanto em humanos quanto em roedores têm crescido há alguns anos. Além de já ter sido demonstrado que o perfil farmacocinético deste medicamento em adolescentes é semelhante ao de adultos sem eventos adversos graves (FAESSEL *et al.*, 2010), um estudo preliminar demonstrou a segurança e viabilidade em usar a vareniclina como tratamento para o transtorno do tabagismo em jovens fumantes (GRAY *et al.*, 2012). Estudos também mostraram que os adolescentes não apresentaram taxas significativas de abstinência durante o tratamento (KIM *et al.*, 2011) e que existem evidências da eficiência da vareniclina ao final do tratamento, mas não a longo prazo (BAILEY *et al.*, 2012). Sua concentração máxima ocorre dentro de cerca de 3-4 horas após a administração

oral numa única dose de 1 ou 3 mg (JIMÉNEZ-RUIZ., *et al* 2009), enquanto concentrações plasmáticas constantes são normalmente atingidas dentro de 4 dias após doses regulares em adultos saudáveis (FAESSEL *et al.*, 2006). A meia-vida da vareniclina é de aproximadamente 24 h e o consumo de alimentos não prejudica sua concentração plasmática nem seus parâmetros farmacocinéticos (JIMÉNEZ-RUIZ., *et al* 2009; FAESSEL *et al.*, 2006) Sua metabolização e excreção são simples em camundongos, ratos, macacos e seres humanos (OBACH *et al.*, 2006b).

Além dos âmbitos comportamentais e sintomáticos, evidências neuroquímicas sustentam a hipótese de que a vareniclina atenua os efeitos da abstinência através do seu mecanismo de ação. É sabido que a vareniclina atua como agonista parcial dos nAChR $\alpha 4\beta 2$ e total dos $\alpha 7$ (COE *et al.*, 2005; MIHALAK *et al.*, 2006; ROLLEMA *et al.*, 2007), exibindo eficácia e potência similar tanto em humanos quanto em ratos (COE *et al.*, 2005). Ao ligar-se nos nAChR $\alpha 4\beta 2$, a vareniclina promove 60% da liberação máxima de dopamina que a nicotina é capaz de induzir, além de dessensibilizar os receptores $\alpha 7$ de forma rápida, mantendo-os inativos, diminuindo ainda mais os impactos da nicotina sob a liberação de dopamina (JIMÉNEZ-RUIZ *et al.*, 2009) e, conseqüentemente, diminuindo os sintomas de abstinência. Em experimentos com ratos, o pré-tratamento com vareniclina diminuiu a auto-administração de nicotina em 50% (ROLLEMA, 2007). Desta forma, a vareniclina age reduzindo a severidade dos efeitos de retirada da nicotina (GONZALES *et al.*, 2006; JORENBY *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo buscou analisar os efeitos neuroquímicos do tratamento com vareniclina durante a adolescência de camundongos Suíços previamente expostos (durante o início da adolescência) à fumaça de cigarros experimentais com uma concentração intermediária de nicotina. Analisamos as possíveis mudanças na expressão das subunidades $\alpha 4$, $\beta 2$ e $\alpha 7$ de receptores colinérgicos nicotínicos no hipocampo de camundongos adolescentes. Além disso, analisamos o conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) e do transportador de dopamina (DAT) nesta mesma estrutura.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar, em PN41, os efeitos da exposição à fumaça de cigarro nos conteúdos das subunidades $\alpha 4$, $\beta 2$ e $\alpha 7$ de receptores colinérgicos e nos conteúdos da TH e do DAT no hipocampo de camundongos adolescentes através de Western blotting;
- b) Analisar, em PN56, os efeitos da exposição à fumaça de cigarro seguido do tratamento com vareniclina nos conteúdos das subunidades $\alpha 4$, $\beta 2$ e $\alpha 7$ de receptores colinérgicos e nos conteúdos da TH e do DAT no hipocampo de camundongos adolescentes através da técnica de Western blotting.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados 93 camundongos Suíços de 31 ninhadas. Os animais foram criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro num ciclo diário de 12 horas claro/escuro (fotoperíodo iniciando 02:00 da manhã), temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e com livre acesso à água filtrada e comida (ração especial para roedores). O protocolo experimental utilizado, descrito a seguir foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) (CEUA/022/2016).

3.1 Animais

Para obtenção de ninhadas experimentais foram utilizados camundongos adultos, os acasalamentos foram realizados com pareamento de até três fêmeas para um macho. Ao completarem duas semanas de cruzamento, as fêmeas possivelmente grávidas foram individualizadas em gaiolas (dimensões 30 cm \times 20 cm \times 13 cm) e observadas até o nascimento da prole, considerado como o primeiro dia pós-natal (PN1). Para padronização do aporte alimentar desses animais, foram utilizadas ninhadas cujo número de animais fosse entre 8 e 12 filhotes. A separação materna foi realizada em PN25 e, em PN27, os filhotes foram alojados em caixas experimentais conforme o sexo, com o mínimo de 2 e o máximo de 5 animais por caixa, evitando o estresse por isolamento. Todos os animais foram identificados através de perfurações nas orelhas utilizando um tatuador, agulhas hipodérmicas BD descartáveis tamanho 0,45 \times 13 mm (26G ½”) e tinta para tatuagem animal (Animal Tattoo Ink Paste, Ketchum Manufacturing INC, Canadá).

3.2 Grupos experimentais

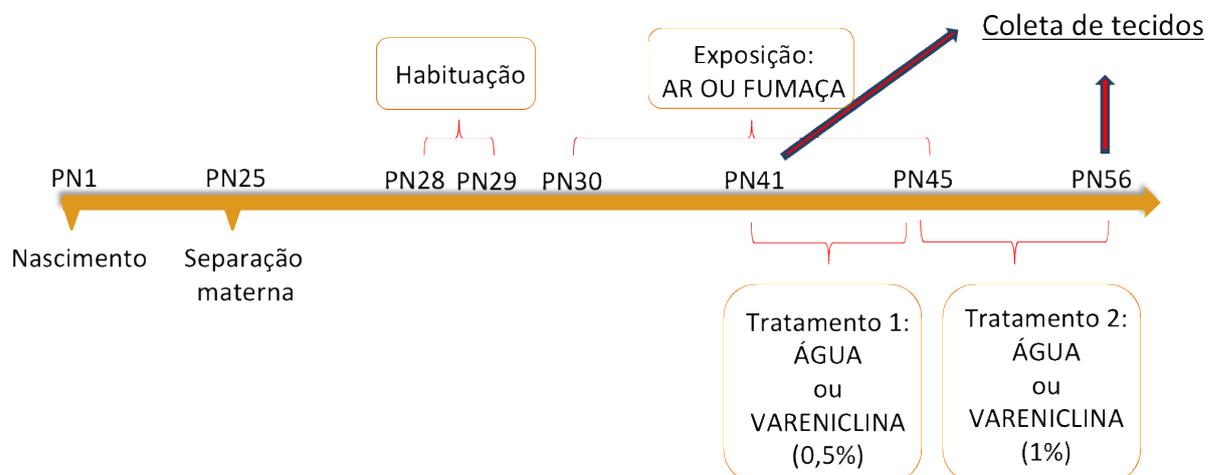
Os animais foram separados inicialmente por sexo e por dois grupos de exposição: grupo AR e grupo FUM (fumaça). Esses grupos foram subdivididos para o tratamento nos grupos: água (H₂O) e vareniclina (VAR). Além disso, foram subdivididos por idade em que foram eutanasiados: PN41 (durante a exposição) e PN56 (ao final do tratamento) (quadro 1). Dessa forma este projeto analisou dois grupos de exposição, dois tratamentos, dois sexos e duas datas de eutanásia, resultando em doze grupos experimentais. A linha do tempo de experimento é apresentada na figura 5.

Quadro 1 - Grupos experimentais

EXPO	SEXO	IDADE	TTO	N
AR	F	41		8
		56	ÁGUA	8
	VAR		8	
	M	41		8
		56	ÁGUA	8
	VAR		8	
FUM	F	41		7
		56	ÁGUA	8
	VAR		8	
	M	41		6
		56	ÁGUA	8
	VAR		8	

Legenda: EXPO: exposição em que os animais foram submetidos; EUT: período em que o animal foi eutanasiado; TTO: tipo de tratamento utilizado; N: número de animais por grupo; FUM: fumaça; F: fêmeas; M: machos; VAR: vareniclina; N: número de animais utilizados por grupo.

Figura 4 - Linha do tempo



Legenda: PN: dia pós-natal.

Fonte: A autora, 2022.

3.3 Período de habituação e exposição à fumaça de cigarro

Inicialmente, os animais experimentais foram separados aleatoriamente em dois grupos (AR e FUM). A habituação foi realizada em PN28 e PN29, onde os animais do grupo FUM foram submetidos a 2 e 4 horas (respectivamente) de exposição à fumaça de cigarros experimentais do tipo 3R4F (contendo 0,73 mg de nicotina, dose intermediária; Kentucky Tobacco Research & Development Center - KTRDC, College of Agriculture, University of Kentucky) em uma câmara que recebe a fumaça gerada em uma máquina de fumaça automática (Teague Enterprises, Davis, CA) (figura 5). De PN30 a PN45, os animais foram submetidos à exposição de 8 horas diárias (corpo inteiro) na mesma máquina, iniciando às 8 horas e terminando às 16 horas. O grupo controle (AR) foi exposto somente a ar, em uma câmara semelhante à da fumaça.

A máquina da fumaça realiza uma aspiração por minuto, equivalente a uma tragada, descartando um cigarro a cada 9 minutos, totalizando 53 cigarros por dia durante a exposição. A aspiração resulta em dois tipos de fumaça: 1) fumaça principal, equivalente ao fumo ativo; 2) fumaça secundária, produto da queima que se dissipa no ambiente a partir da ponta do cigarro. Ambas as fumaças são sugadas para uma única câmara onde são misturadas, sendo 11% da fumaça principal e 89% da secundária, simulando o fumo ativo (ABREU-VILLAÇA *et al.*, 2010; 2013; SLOTKIN *et al.*, 2001). Durante o período de exposição, o ciclo claro/escuro (a partir das 14:00 h) foi respeitado. Ao fim da exposição (16:00 h), as caixas com os animais eram transportadas cobertas com uma cortina que impede a passagem da luz, garantindo o ciclo. Os animais que foram expostos ao ar passaram por procedimentos idênticos aos dos animais expostos à fumaça, exceto o fato do ar injetado não conter fumaça de cigarro.

Figura 5 - Máquina de produção automática de fumaça de cigarro, Teague Enterprises (E.U.A.)



Legenda: Fotografia em vista frontal da máquina, com o equipamento de geração da fumaça do cigarro na porção superior e a câmara de exposição contendo gaiolas na porção inferior.

Fonte: A autora, 2022.

3.4 Período de tratamento com vareniclina

Os animais do grupo VAR foram submetidos a um tratamento com vareniclina (Sigma) diluída em água através da técnica de gavagem duas vezes ao dia (às 7:00 h e às 17:00 h). O tratamento foi dividido em duas etapas distintas: 1) de PN41 a PN45, os animais foram administrados com vareniclina na dose de 0,5 mg/kg (VAR1); 2) de PN46 a PN56 foram administrados na dose de 1,0 mg/kg (VAR2). Os animais que não receberam vareniclina foram administrados, também por gavagem, com um volume equivalente somente de água (grupo H2O). As doses foram selecionadas com base na experiência prévia do orientador no uso destas drogas em modelos experimentais (CLAUDIO-NETO, 2016).

3.5 Coleta de tecidos

Em PN41 e PN56, os animais de seus respectivos grupos foram sacrificados e os tecidos foram retirados para análise posterior. Para identificar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro, em PN41, os animais foram removidos individualmente das câmaras de exposição, foram eutanasiados e tiveram seus cérebros removidos e dissecados, procedimento em que separamos o hipocampo para análise protéica através de Western blotting. Os animais do grupo PN56 também foram submetidos ao mesmo procedimento, porém foram retirados de suas caixas diretamente do biotério. As amostras obtidas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para análise posterior.

3.6 Análise da expressão de proteínas por Western blotting

Inicialmente, as amostras de CPF e dos hipocampos foram homogeneizadas em 100 μl de tampão RIPA (Sigma). Após a homogeneização, as proteínas presentes nas amostras foram dosadas através do ensaio de Bradford (Zor & Selinger, 1996; Kruger, 2009).

As proteínas foram separadas em gel de acrilamina e bisacrilamida (concentração de 10%) (SDS-PAGE) e, em seguida, transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Hybond-P ECL membrane; Amersham Pharmacia Biotech, E.U.A.). Para evitar que o anticorpo se ligasse inespecificamente, as membranas foram incubadas com BSA 2% (albumina de soro bovino) diluída em T-TBS (solução salina tamponada com tris) sob agitação por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com anticorpo primário específico para cada proteína (quadro 2) (*overnight*, 5°C). Passado este período, as membranas foram lavadas e incubadas por 1 h com o anticorpo secundário em temperatura ambiente, foram lavadas e incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase, também por 1 h. As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e tratadas por quimioluminescência (ChemiDoc - BioRad), com o auxílio do programa Image LAB (BioRad).

Quadro 2 - Anticorpos utilizados

	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
alfa-4	Anti- α 4, mouse, 1:5.000 (Merck Millipore)	anti-mouse, 1:10.000
beta-2	Anti- β 2, rabbit, 1:5.000 (Merck Millipore)	anti-rabbit, 1:10.000
alfa-7	Anti- α 7, rabbit, 1:5.000 (Sigma)	anti-rabbit, 1:10.000
TH	Anti-TH, mouse, 1:5.000 (Sigma)	anti-mouse, 1:10.000
DAT	Anti-DAT, rabbit, 1:1.000 (Merck Millipore)	anti-rabbit, 1:10.000

4 RESULTADOS

4.1. PN41

A tabela 1 apresenta os resultados das uANOVAs de maior ordem para os dados obtidos em PN41.

Tabela 1 - Resultados das uANOVAs globais para os dados dos marcadores no hipocampo de camundongos Suíços em PN41

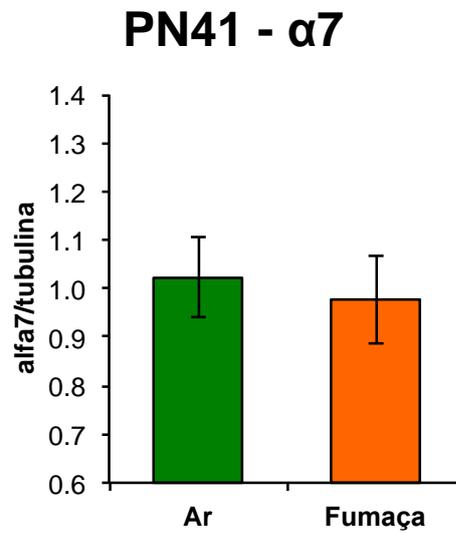
$\alpha 7$		
Fatores	<i>F (g.l.)</i>	<i>p</i>
Exposição	0,1 (1,20)	n.s.
Sexo	1,0 (1,20)	n.s.
Exposição × Local	1,6 (1,20)	n.s.
$\alpha 4$		
Fatores	<i>F (g.l.)</i>	<i>p</i>
Exposição	1,1 (1,20)	n.s.
Sexo	0,2 (1,20)	n.s.
Exposição × Local	0,1 (1,20)	n.s.
$\beta 2$		
Fatores	<i>F (g.l.)</i>	<i>p</i>
Exposição	0,4 (1,20)	n.s.
Sexo	2,3 (1,20)	n.s.
Exposição × Local	< 0,1 (1,20)	n.s.
TH		
Fatores	<i>F (g.l.)</i>	<i>p</i>
Exposição	3,2 (1,20)	0,087
Sexo	< 0,1 (1,20)	n.s.
Exposição × Local	< 0,1 (1,20)	n.s.
DAT 55 kDa		
Fatores	<i>F (g.l.)</i>	<i>p</i>
Exposição	< 0,1 (1,20)	n.s.
Sexo	1,3 (1,20)	n.s.
Exposição × Local	< 0,1 (1,20)	n.s.
DAT 80 kDa		
Fatores	<i>F (g.l.)</i>	<i>p</i>
Exposição	0,1 (1,20)	n.s.
Sexo	1,2 (1,20)	n.s.
Exposição × Local	0,3 (1,20)	n.s.

Legenda: n.s.: não significativo.
 Fonte: A autora, 2022.

4.1.1. Alfa-7

Não foram identificados efeitos significativos de Exposição ou Sexo para os dados de alfa-7 em PN41 (gráfico 1).

Gráfico 1 - Dados referentes à subunidade alfa-7 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)

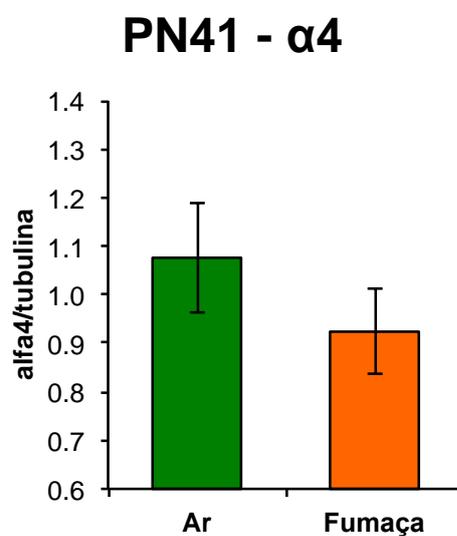


Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Valores são média ± EPM.
Fonte: A autora, 2022.

4.1.2. Alfa-4

Não foram identificados efeitos significativos de Exposição ou Sexo para os dados de alfa-4 em PN41 (gráfico 2).

Gráfico 2 - Dados referentes à subunidade alfa-4 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)

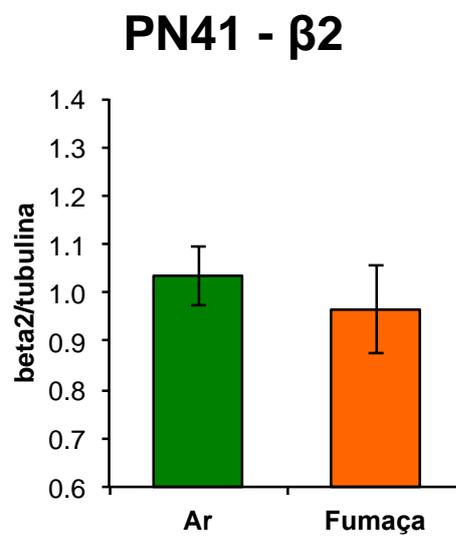


Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Valores são média \pm EPM.
Fonte: A autora, 2022.

4.1.3. Beta-2

Não foram identificados efeitos significativos de Exposição ou Sexo para os dados de beta-2 em PN41 (gráfico 3).

Gráfico 3 - Dados referentes à subunidade beta-2 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)

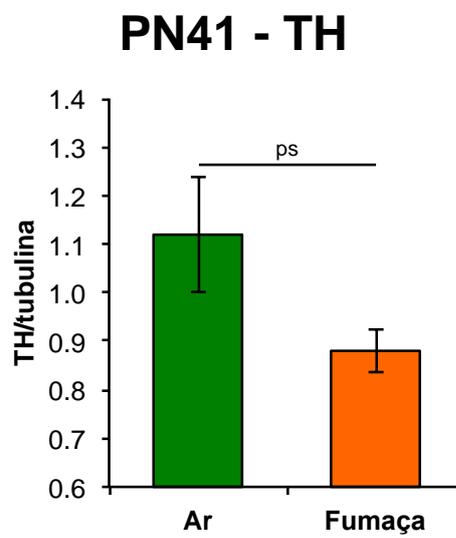


Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Valores são média \pm EPM.
Fonte: A autora, 2022.

4.1.4. TH

Não foram identificados efeitos significativos de Exposição ou Sexo para os dados de TH em PN41 (gráfico 4).

Gráfico 4 - Dados referentes à enzima tirosina hidroxilase no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)



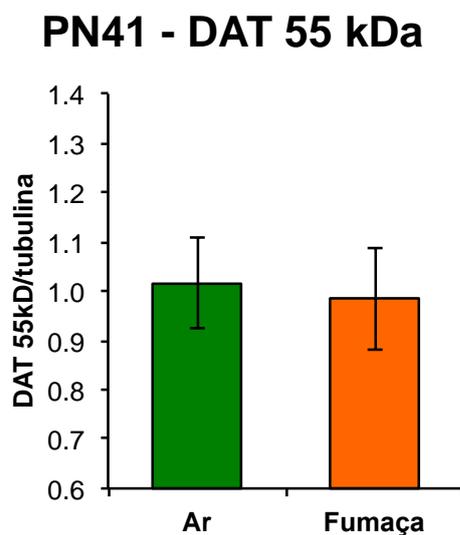
Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Valores são média ± EPM. $p_{0,10} > p > 0,05$.
Fonte: A autora, 2022.

4.1.5. DAT

4.1.5.1. 55 kDa

Não foram identificados efeitos significativos de Exposição ou Sexo para os dados de DAT 55 kDa em PN41 (gráfico 5).

Gráfico 5 - Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 55 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)

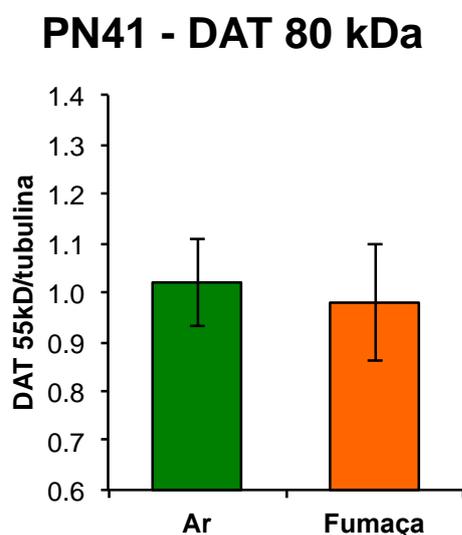


Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Valores são média ± EPM.
Fonte: A autora, 2022.

4.1.5.2. 80 kDa

Não foram identificados efeitos significativos de Exposição ou Sexo para os dados de DAT 80 kDa em PN41 (gráfico 6).

Gráfico 6 - Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 80 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN41, segmentados por tipo de exposição (Ar e Fumaça)



Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Valores são média ± EPM.
Fonte: A autora, 2022.

4.2. PN56

Tendo em vista a abordagem estatística utilizada na análise dos dados referentes aos animais PN56, as tabelas com os resultados das uANOVAs de maior ordem de cada marcador serão apresentadas separadamente por marcador.

4.2.1. Alfa-7

A tabela 2 apresenta os resultados da uANOVA de maior ordem para os dados da subunidade alfa-7 do receptor colinérgico obtidos no hipocampo de camundongos Suíços em PN56.

Tabela 2 - Resultados das uANOVAs globais para os dados de alfa-7 em PN56

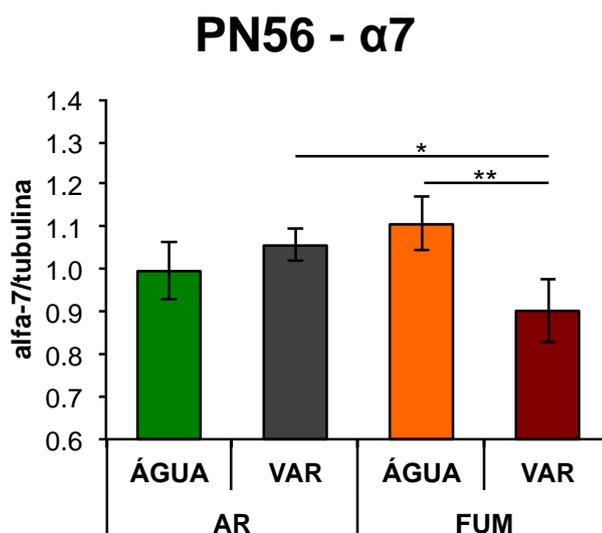
$\alpha 7$		
	<i>F (g.l.)</i>	<i>p</i>
Unidimensional		
Grupo	3,2 (1, 40)	0,035
Sexo	4,1 (1, 40)	0,049
Grupo \times Sexo	8,2 (1, 40)	< 0,001
Bidimensional		
Exposição	0,2 (1, 40)	n.s.
Tratamento	2,1 (1, 40)	n.s.
Sexo	4,1 (1, 40)	0,049
Exposição \times Tratamento	7,2 (1, 40)	0,011
Exposição \times Sexo	13,4 (1, 40)	0,001
Tratamento \times Sexo	7,4 (1, 40)	0,010
Exposição \times Tratamento \times Sexo	3,8 (1, 40)	0,058

Legenda: n.s.: não significativo.

Fonte: A autora, 2022.

Comparações par a par (sem separação por sexo) para uANOVA de maior ordem indicaram que o grupo FUM-VAR apresentava uma diminuição no conteúdo da subunidade alfa-7 do receptor colinérgico quando comparado aos grupos AR-VAR e FUM-ÁGUA (gráfico 7). Após a separação por Sexo (gráfico 8), foi identificado que as fêmeas do grupo AR-ÁGUA apresentavam valores menores do que os dos grupos AR-VAR e FUM-ÁGUA. Para os machos, o grupo AR-ÁGUA apresentou os maiores valores quando comparados aos demais grupos enquanto o grupo FUM-VAR apresentou os menores valores.

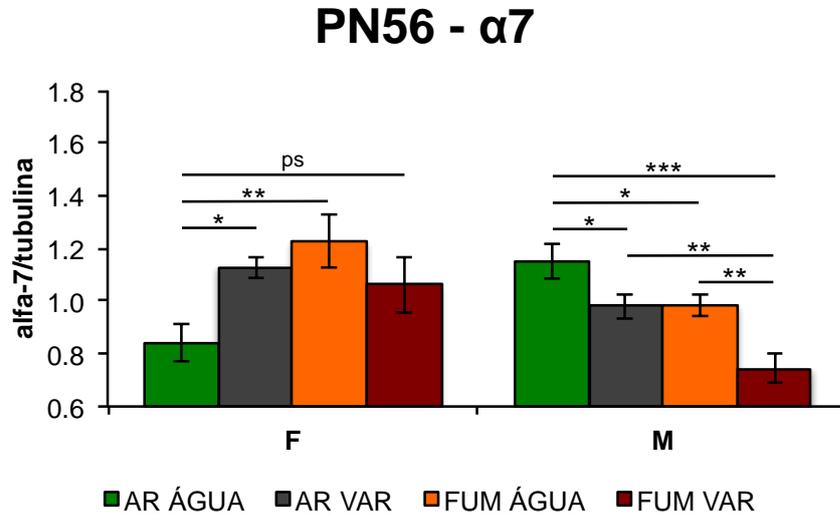
Gráfico 7 - Dados referentes à subunidade alfa-7 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento



Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média ± EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 8 - Dados referentes à subunidade alfa-7 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição, tratamento e sexo



Legenda: F: fêmeas; M: machos. Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média \pm EPM. ^{ps}0,10 > p > 0,05, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.
Fonte: A autora, 2022.

4.2.2. Alfa-4

A tabela 3 apresenta os resultados da uANOVA de maior ordem para os dados da subunidade alfa-4 do receptor colinérgico obtidos no hipocampo de camundongos Suíços em PN56 (gráficos 9 e 10).

Tabela 3 - Resultados das uANOVAs globais para os dados de alfa-4 em PN56

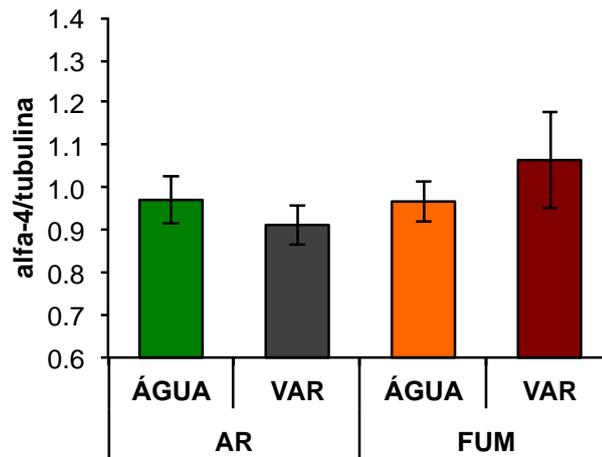
$\alpha 4$	F (g.l.)	p
Unidimensional		
Grupo	0,9 (1, 40)	n.s.
Sexo	0,3 (1, 40)	n.s.
Grupo \times Sexo	4,1 (1, 40)	0,012
Bidimensionais		
Exposição	1,3 (1, 40)	n.s.
Tratamento	0,1 (1, 40)	n.s.
Sexo	0,3 (1, 40)	n.s.
Exposição \times Tratamento	1,4 (1, 40)	n.s.
Exposição \times Sexo	4,1 (1, 40)	0,049
Tratamento \times Sexo	8,1 (1, 40)	0,007
Exposição \times Tratamento \times Sexo	0,1 (1, 40)	n.s.

Legenda: n.s.: não significativo.
Fonte: A autora, 2022.

Após a separação por Sexo (gráfico 10), foi identificado que as fêmeas do grupo FUM-VAR apresentavam valores maiores do que os demais grupos.

Gráfico 9 - Dados referentes à subunidade alfa-4 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento

PN56 - $\alpha 4$

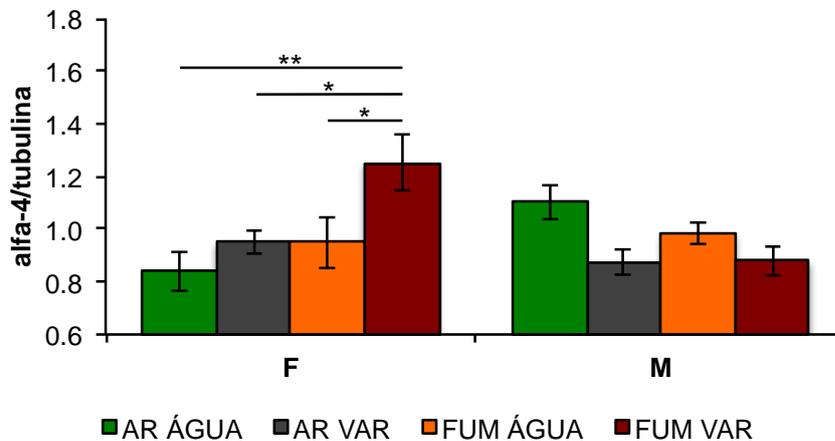


Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média ± EPM.

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 10 - Dados referentes à subunidade alfa-4 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição, tratamento e sexo

PN56 - $\alpha 4$



Legenda: F: fêmeas; M: machos. Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média ± EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: A autora, 2022.

4.2.3. Beta-2

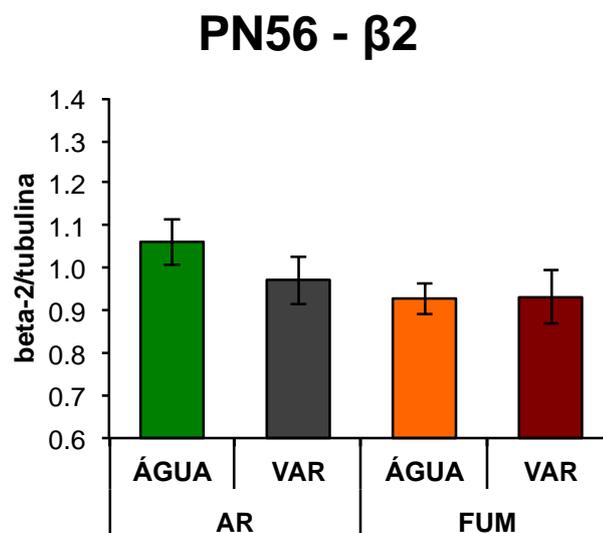
A tabela 4 apresenta os resultados da uANOVA de maior ordem para os dados da subunidade beta-2 do receptor colinérgico obtidos no hipocampo de camundongos Suíços em PN56. Não foram observados efeitos ou interações significativas (gráfico 11).

Tabela 4 - Resultados das uANOVAs globais para os dados de beta-2 em PN56

β2		
	F (g.l.)	p
Unidimensional		
Grupo	1,3 (1, 40)	n.s.
Sexo	0,6 (1, 40)	n.s.
Grupo × Sexo	0,8 (1, 40)	n.s.
Bidimensionais		
Exposição	2,6 (1, 40)	n.s.
Tratamento	0,6 (1, 40)	n.s.
Sexo	0,1 (1, 40)	n.s.
Exposição × Tratamento	0,7 (1, 40)	n.s.
Exposição × Sexo	0,7 (1, 40)	n.s.
Tratamento × Sexo	0,3 (1, 40)	n.s.
Exposição × Tratamento × Sexo	1,3 (1, 40)	n.s.

Legenda: n.s.: não significativo.
Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 11 - Dados referentes à subunidade beta-2 do receptor colinérgico no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento



Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média ± EPM.
Fonte: A autora, 2022.

4.2.4. TH

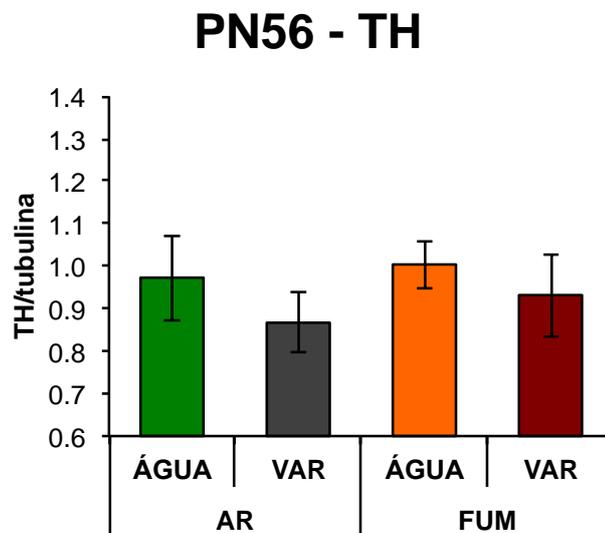
A tabela 5 apresenta os resultados da uANOVA de maior ordem para os dados da enzima tirosina hidroxilase obtidos no hipocampo de camundongos Suíços em PN56. Não foram observados efeitos ou interações significativas (gráfico 12).

Tabela 5 - Resultados das uANOVAs globais para os dados de TH em PN56

TH		
	<i>F (g.l.)</i>	<i>p</i>
Unidimensional		
Grupo	0,5 (1, 40)	n.s.
Sexo	1,1 (1, 40)	n.s.
Grupo × Sexo	1,5 (1, 40)	n.s.
Bidimensionais		
Exposição	0,3 (1, 40)	n.s.
Tratamento	1,2 (1, 40)	n.s.
Sexo	1,1 (1, 40)	n.s.
Exposição × Tratamento	< 0,1 (1, 40)	n.s.
Exposição × Sexo	0,9 (1, 40)	n.s.
Tratamento × Sexo	3,5 (1, 40)	0,069
Exposição × Tratamento × Sexo	0,2 (1, 40)	n.s.

Legenda: n.s.: não significativo.
Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 12 - Dados referentes à enzima tirosina hidroxilase no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento



Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média ± EPM.
Fonte: A autora, 2022.

4.2.5. DAT 55 kDa

A tabela 6 apresenta os resultados da uANOVA de maior ordem para os dados da proteína transportadora de dopamina (banda de 55 kDa) obtidos no hipocampo de camundongos Suíços em PN56 (gráficos 13 e 14).

Tabela 6 - Resultados das uANOVAs globais para os dados de DAT 55 kDa em PN56.

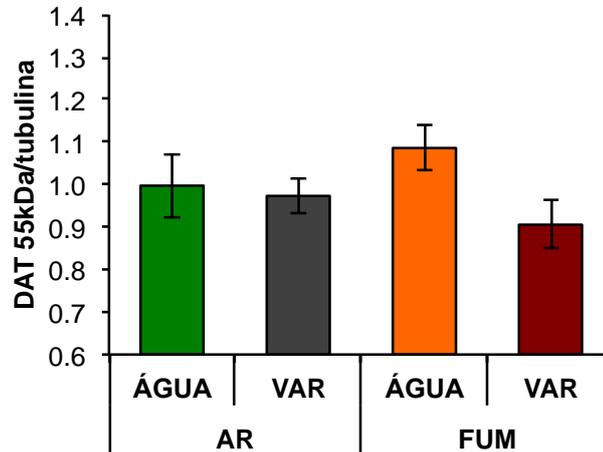
DAT 55 kDa		
	F (g.l.)	p
Unidimensional		
Grupo	1,9 (1, 40)	n.s.
Sexo	0,4 (1, 40)	n.s.
Grupo × Sexo	3,1 (1, 40)	0,039
Bidimensionais		
Exposição	< 0,1 (1, 40)	n.s.
Tratamento	3,6 (1, 40)	0,064
Sexo	0,4 (1, 40)	n.s.
Exposição × Tratamento	2,1 (1, 40)	n.s.
Exposição × Sexo	0,1 (1, 40)	n.s.
Tratamento × Sexo	9,1 (1, 40)	0,004
Exposição × Tratamento × Sexo	< 0,1 (1, 40)	n.s.

Legenda: n.s.: não significativo.
 Fonte: A autora, 2022.

Após a separação por Sexo (gráfico 14), foi identificado que os machos do grupo AR-ÁGUA apresentavam valores maiores do que o grupo FUM-VAR e que o grupo FUM-ÁGUA apresentavam valores maiores do que os grupos AR-VAR e FUM-VAR.

Gráfico 13 - Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 55 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento

PN56 - DAT 55 kDa

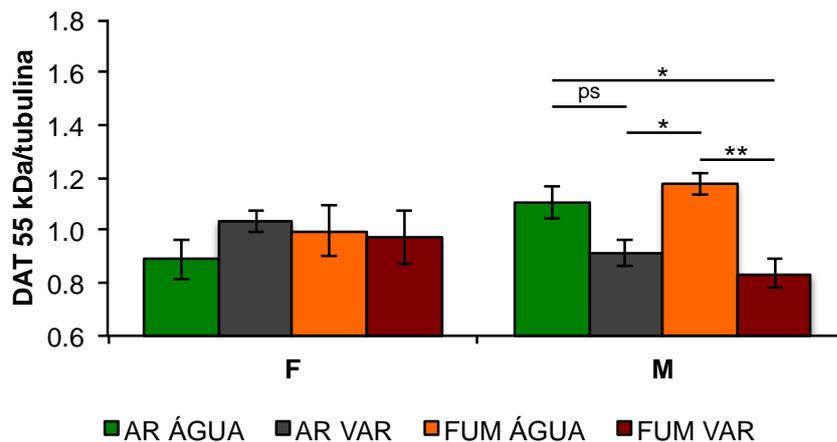


Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 14 - Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 55 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição, tratamento e sexo

PN56 - DAT 55 kDa



Legenda: F: fêmeas; M: machos. Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média \pm EPM. $^{ns}0,10 > p > 0,05$, $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$.

Fonte: A autora, 2022.

4.2.6. DAT 80 kDa

A tabela 7 apresenta os resultados da uANOVA de maior ordem para os dados da proteína transportadora de dopamina (banda de 80 kDa) obtidos no hipocampo de camundongos Suíços em PN56 (gráficos 15 e 16).

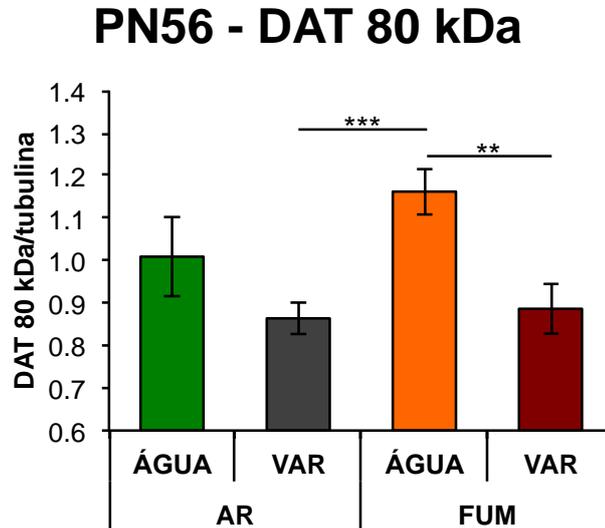
Tabela 7 - Resultados das uANOVAs globais para os dados de DAT 80 kDa em PN56

DAT 80 kDa		
	F (g.l.)	p
Unidimensional		
Grupo	6,2 (1, 40)	0,002
Sexo	0,1 (1, 40)	n.s.
Grupo × Sexo	6,6 (1, 40)	0,001
Bidimensionais		
Exposição	2,5 (1, 40)	n.s.
Tratamento	14,6 (1, 40)	< 0,001
Sexo	0,1 (1, 40)	n.s.
Exposição × Tratamento	1,4 (1, 40)	n.s.
Exposição × Sexo	2,6 (1, 40)	n.s.
Tratamento × Sexo	16,6 (1, 40)	< 0,001
Exposição × Tratamento × Sexo	0,5 (1, 40)	n.s.

Legenda: n.s.: não significativo.
 Fonte: A autora, 2022.

Comparações par a par (sem separação por sexo) para uANOVA de maior ordem indicaram o grupo FUM-ÁGUA apresentava um aumento no conteúdo da proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 80 kDa) quando comparado aos grupos AR-VAR e FUM-VAR (gráfico 15). Após a separação por Sexo (gráfico 16), foi identificado que os machos dos grupos AR-ÁGUA e FUM-ÁGUA apresentavam valores maiores do que os grupos AR-VAR e FUM-VAR.

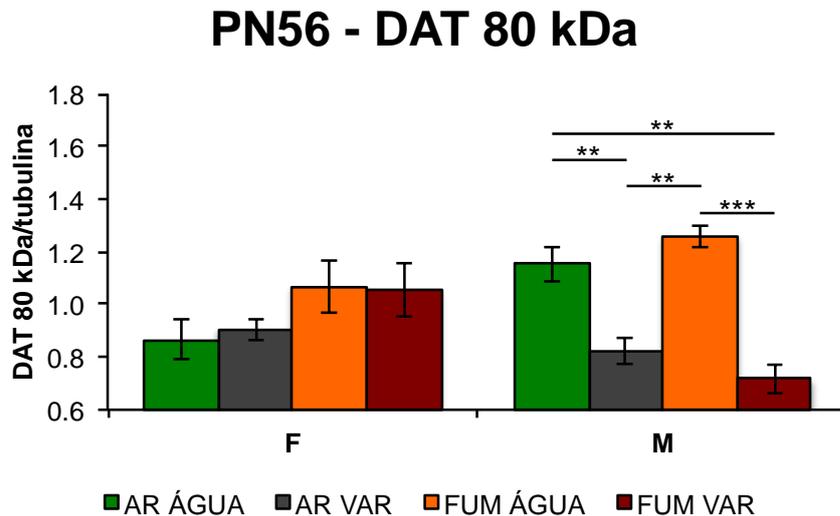
Gráfico 15 - Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 80 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição e tratamento



Legenda: Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média ± EPM. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 16 - Dados referentes à proteína transportadora de dopamina (DAT, banda de 80 kDa) no hipocampo de camundongos Suíços em PN56, segmentados por tipo de exposição, tratamento e sexo



Legenda: F: fêmeas; M: machos. Ar: grupo exposto ao ar; Fumaça: grupo exposto à fumaça do cigarro. Água: grupo tratado com água; Var: grupo tratado com vareniclina. Valores são média ± EPM. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2022.

5 DISCUSSÃO

5.1. PN41

O presente projeto buscou mimetizar, em camundongos, a via de exposição à nicotina utilizada por humanos. É importante ressaltar que analisar o conteúdo hipocampal de nAChRs nos animais que estão em pleno período de exposição à fumaça de cigarro há onze dias (PN41), é uma novidade na literatura. Um dos modelos mais utilizados para camundongos e ratos adolescentes visa a exposição à fumaça durante 15 dias (PN30 – PN45), de forma que qualquer tipo de teste ou análise é realizada ao final da exposição, não durante (ABREU-VILLAÇA *et al.*, 2017).

5.1.1. Efeitos da exposição sob os nAChR dos subtipos alfa-4, beta-2 e alfa-7

No presente estudo, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas na expressão destes receptores entre os grupos (ao ar ou à fumaça), é possível notar uma tendência de queda nos subtipos de receptores alfa-4 e beta-2 após onze dias de exposição (gráficos 2 e 3). É bem documentado que os nAChR mais sensíveis aos efeitos deletérios da nicotina durante a adolescência são os $\alpha 4\beta 2$, encontrados abundantemente no hipocampo tanto em humanos quanto em roedores (ALKONDON & ALBUQUERQUE, 2004; DOURA *et al.*, 2008). Em experimentos eletrofisiológicos *in vitro*, aplicações prolongadas de nicotina ou ACh promoveram um declínio progressivo da corrente transportada por nAChRs (KATZ & THESLEFF, 1957; PENG *et al.*, 1994; LESTER & DANI, 1995; FENSTER *et al.*, 1997; PIDOPLICHKO *et al.*, 1997; CORRINGER *et al.*, 1998), indicando uma possível dessensibilização dos nAChRs. A dessensibilização é conhecida por ser dose e tempo dependente, sendo necessária uma exposição crônica à nicotina para que ocorra (DANI, 2001), e é tida como responsável pela futura suprarregulação ou infrarregulação destes receptores, dependendo do tempo em que o receptor foi exposto (MARKS *et al.*, 1983; SCHWARTZ & KELLAR, 1985; GINIATULLIN, 2005). Em um estudo realizado no nosso laboratório, Abreu-Villaça e colaboradores (ABREU-VILLAÇA *et al.*, 2003) expuseram os

animais à nicotina injetada diariamente durante sete dias (PN30-PN37), e foi possível observar um aumento significativo no número de ligações nos nAChRs presentes no hipocampo em PN37 (logo após o fim da exposição), seguido de uma queda em PN45 e um ressurgimento em PN65.

Estes dados são indícios, mesmo que tênues, de que, em PN41, poderia estar ocorrendo o início da infrarregulação causada pela exposição crônica à nicotina, fenômeno esse que poderia ter se expressado de forma significativa em PN45, ao final da exposição. Os receptores do subtipo alfa-7 dos animais expostos à nicotina também apresentaram uma tendência de queda em relação ao controle (gráfico 1), porém menos intensa que os alfa-4 e beta-2. Esse efeito pode ter ocorrido pelo fato da nicotina ter mais afinidade com os alfa-4 e beta-2 do que com os alfa-7 (FLORES *et al.* 1992; ALKONDON *et al.*, 1997; SUDWEEKS & YAKEL 2000; BELL *et al.* 2011).

5.1.2. Efeitos da exposição sob TH

O presente trabalho buscou analisar, em PN41, os efeitos da exposição à fumaça de cigarro no conteúdo de TH no hipocampo dos animais de nosso modelo experimental. Apesar dos resultados estatísticos não acusarem diferenças significativas entre os grupos (ar e fumaça), é possível observar uma tendência (próximo da significância) de diminuição no conteúdo de TH após onze dias de exposição crônica à fumaça (gráfico 4), sugerindo o início da diminuição na síntese de dopamina no hipocampo destes animais. A TH é a enzima percussora na síntese de catecolaminas, presente em todos os neurônios dopaminérgicos. Esta enzima catalisa a hidroxilação de tirosina em L-DOPA, gerando a molécula de dopamina (HOKFELT *et al.*, 1976; MOLINOFF *et al.*, 1971). É documentado que o excesso de dopamina pode ser prejudicial para o neurônio, tendo em vista que estas moléculas podem gerar metabólitos reativos de quinona (STOKES *et al.*, 1999), que podem formar espécies reativas de oxgênio (ABATE *et al.*, 1988) que modificam o DNA (AHN *et al.*, 2011) e ativam vias apoptóticas (STROKES *et al.*, 1999). A regulação desta via pode ser realizada a partir da própria dopamina que, ao ligar-se à TH, inibe sua ativação (KAUSHIK *et al.*, 2006; COYLE & AXELROD, 1971), diminuindo, assim, a produção de dopamina na célula.

Em um estudo realizado por Pinheiro e colaboradores, ratos que foram expostos à fumaça de cigarro juntamente com suas progenitoras, portanto ainda em período de

amamentação, apresentaram taxas menores de TH no VTA em PN180 em comparação aos animais controle (que não foram expostos), mostrando que a exposição precoce à fumaça de cigarro pode provocar alterações a longo prazo na síntese de dopamina, tal como pode ser observado em animais adultos. Estes dados indicam que a exposição à fumaça de cigarro em idade precoce pode afetar o padrão de síntese dopaminérgica natural, gerando consequências que podem ser identificadas na idade adulta (PINHEIRO *et al.*, 2015).

5.1.3. Efeitos da exposição sob DAT

No presente trabalho, buscamos analisar os efeitos da fumaça de cigarro sob a expressão de DAT no hipocampo de animais adolescentes. Com o anticorpo que utilizamos (anti-dopamine transporter AB1591P – Merk Millipore) para a análise por Western blotting, foi possível observar a proteína tanto no peso molecular de 80 kDa, sendo seu peso original, quanto a DAT glicosilada, em 55 kDa, em que o peso é reduzido devido à presença de frações de carboidratos e à ação de neuraminidases e N-Glicanases. Analisamos, portanto, as duas bandas de forma separada e não houve efeito da exposição em DAT em nenhuma das duas bandas. Este foi o primeiro estudo a analisar o conteúdo de DAT sob o hipocampo dos animais após onze dias de exposição à fumaça em PN41. A literatura acerca dos efeitos da fumaça de cigarro (o que inclui a nicotina) sob os DATs ainda não está bem estabelecida devido à expressiva discrepância entre os resultados observados na literatura (DANIELSON *et al.*, 2011).

A proteína transportadora de dopamina (DAT), encontrada em neurônios dopaminérgicos pré- e pós-sinápticos, tem como função regular a concentração extracelular de dopamina. Este mecanismo ocorre através da captação da dopamina de fora para dentro da célula (GAINETDINOV *et al.*, 1998; BENOIT-MARAND *et al.*, 2000). A liberação de dopamina na fenda sináptica é relacionada aos efeitos de recompensa da via meso-cortico límbica (ARIAS *et al.*, 2009; ORTELLS & ARIAS, 2010; ROLLEMA *et al.*, 2007), porém o desbalanço nos níveis de DAT é relacionado a diversas enfermidades neurológicas como a doença de Parkinson, transtorno de personalidade borderline, esquizofrenia, entre outros (MCHUGH *et al.*, 2015; CALABRESI *et al.*, 2013).

Os efeitos da nicotina sob esse tipo de transportador é consistentemente demonstrado por ser mediado indiretamente pelos nAChRs (DREW *et al.*, 2000; HART AND KSIR, 1996;

MIDDLETON *et al.*, 2004; YAMASHITA *et al.*, 1995; ZHU *et al.*, 2009). Evidências indicam que a nicotina é capaz de afetar a funcionalidade destes transportadores em modelos animais (DANIELSON *et al.*, 2011). Apesar de já ter sido relatado um aumento na captação de dopamina no NAc (HART & KSIR, 1996), no estriado (MIDDLETON *et al.*, 2004; MIDDLETON *et al.*, 2007a) e no CPF (MIDDLETON *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2009) após exposição aguda à nicotina em ratos, evidências experimentais de outros pesquisadores indicam que os efeitos da nicotina sob os DATs são dependentes da dosagem, do tempo de exposição e da região cerebral em que estes transportadores se encontram. Além destes fatores, os efeitos da fumaça de cigarro se diferem dos efeitos gerados pela nicotina isolada. Foi demonstrado que a normicotina, um alcalóide encontrado nas folhas de tabaco, induziu a queda da função de DAT no estriado de ratos (MIDDLETON *et al.*, 2007b).

Portanto, nossos dados sugerem que, apesar da tendência de queda na expressão de TH, o transporte de dopamina no hipocampo de animais adolescentes permaneceu inalterado, mesmo após 11 dias de exposição à fumaça (gráfico 5).

5.2. PN56

A idade PN56, neste trabalho, representa o final do tratamento com vareniclina no grupo dos animais tratados (FUM-VAR) e dez dias de retirada da exposição à fumaça nos animais não tratados (FUM-ÁGUA). Além disso, um grupo que não foi exposto à fumaça foi submetido ao tratamento com vareniclina (AR-VAR) para análise dos efeitos deste fármaco sobre o hipocampo em PN41. Nesta fase do experimento, analisamos o conteúdo hipocampal das subunidades de nAChR alfa-4, beta-2, alfa-7, e o conteúdo de TH e DAT.

5.2.1. Efeitos sob as subunidades alfa-4 e beta-2

Já é bem estabelecido na literatura que a adolescência é um período em que o sistema nervoso central se encontra em pleno desenvolvimento e que o abuso de drogas nesta idade pode causar um desbalanço no desenvolvimento natural de importantes vias neurais que modulam o comportamento humano ao longo da vida. As subunidades alfa-4 e beta-2 de

nAChR são amplamente relacionados a funções cognitivas e são densamente expressos pré- e pós-sinápticamente na região CA1 do hipocampo e no giro denteado (HURST *et al.*, 2013; LEVIN *et al.*, 2006).

A vareniclina, um agonista parcial dos nAChR $\alpha 4\beta 2$, possui vinte vezes mais afinidade com estes receptores que a própria nicotina (ROLLEMA *et al.*, 2007) e é aprovada como tratamento de primeira linha para tratamento do tabagismo. Já foi demonstrado anteriormente que a vareniclina é capaz de gerar a suprarregulação dos nAChR $\alpha 4\beta 2$ em animais adultos que foram previamente expostos à nicotina (HUSSMANN *et al.*, 2014). Em outro experimento realizado também com animais adultos, foi possível observar o aumento da expressão de beta-2 induzida pela vareniclina no hipocampo, mas não de alfa-4 (LANGE-ASSCHENFELDT *et al.*, 2016).

Nossos resultados mostram que, na adolescência, as fêmeas FUM-VAR apresentaram maiores taxas de alfa-4 em comparação aos outros subgrupos (gráfico 10), indicando a suprarregulação desta subunidade no hipocampo dos animais adolescentes. Esse resultado difere dos dados envolvendo a subunidade beta-2, que não apresentou diferenças significativas entre os subgrupos (gráfico 11).

Evidências com humanos indicam que o uso de tabaco afeta homens e mulheres de forma diferenciada. É relatado que as mulheres sentem mais dificuldade em cessar o uso em comparação aos homens, além de levarem menos tempo entre um cigarro e outro. (LYNCH *et al.*, 2002; ROTH *et al.*, 2004). Alguns estudos indicam que o ciclo menstrual pode influenciar no processo de cessação do tabagismo. No final da fase lútea, onde os níveis de estrogênio e progesterona estão em declínio, as mulheres costumam apresentar maiores níveis de desejo e disforia na tentativa de retirada do tabaco em comparação à fase folicular, quando o estradiol e a progesterona estão baixos (CARPENTER *et al.*, 2006). Além disso, as mulheres apresentam 44% maior probabilidade em voltar ao uso dentro de três anos em comparação aos homens (WEINBERGER *et al.*, 2014). Estes dados indicam que as mulheres apresentam maior vulnerabilidade aos efeitos do tabagismo.

5.2.2. Efeitos sob a subunidade alfa-7

A subunidade alfa-7 dos nAChR é expressa principalmente de forma homomérica nos neurônios de quase todas as regiões cerebrais do cérebro de mamíferos (BREESE *et al.*,

1997; QUIK *et al.*, 2000; DRISDEL., 2000), principalmente no hipocampo (PAYLOR, 1998). Ao ser ativado por um agonista, o receptor do tipo alfa-7 promove o fluxo de cálcio para dentro do neurônio através de seu poro, gerando a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (CORDERO-ERAUSQUIN., *et al.*, 2000; ROZENBERG *et al.*, 1989; ZHANG, 1994; ALKONDON *et al.*, 1997; GRAY., 1996). Esta subunidade também parece mediar, em parte, os efeitos da acetilcolina na maturação cerebral. Em comparação aos adultos, os níveis de ligação de α -bungarotoxina, um antagonista da subunidade alfa-7 (CODIGNOLA *et al.*, 1994; SÉGUÉLA *et al.*, 1993), são maiores durante a fase embrionária e pós-natal no cérebro de roedores, especialmente em áreas como o hipocampo e o córtex somatosensorial, sugerindo que os receptores do tipo alfa-7 exercem um importante papel no desenvolvimento cerebral por mediar o fluxo de cálcio na célula (BROIDE *et al.*, 1995; FIEDLER; 1990; HUNT *et al.*, 1999; OSPINA *et al.*, 1998). O desbalanço na ativação destes receptores é relacionado a doenças neurológicas como o Alzheimer e a esquizofrenia (FREEDMAN & GOLDOWITZ, 2010; YAKEL, 2013; DINELEY *et al.*, 2015).

Pesquisas recentes com camundongos knock out que não expressam a subunidade alfa-7 apontam um importante papel destes receptores na auto-administração de nicotina. Embora os camundongos knock-out não apresentem diferença dos controles em sua preferência inicial pela nicotina (WALTERS *et al.*, 2006), seu comportamento de autoadministração diminui ao longo de várias semanas (LEVIN *et al.*, 2006), indicando grande importância destes receptores na ação da nicotina. A vareniclina, um agonista total dos receptores alfa-7, atenua os sintomas de abstinência após a retirada da nicotina, uma vez que compete com a nicotina para se ligar aos nAChR, produzindo efeitos semelhantes porém em menor intensidade (MIHALAK, 2006). Ao ser administrada sozinha, sem a presença da nicotina, a vareniclina aumenta consideravelmente os níveis de liberação de dopamina no NAc. Em contraste, quando administrada junto da nicotina, a vareniclina atenua a liberação de dopamina na via (COE *et al.*, 2005). Este efeito foi demonstrado em nosso trabalho (gráfico 7), uma vez que o grupo FUM-VAR apresentou menores quantidades do receptor alfa-7 em comparação ao grupo AR-VAR, sugerindo que a baixa liberação de dopamina no grupo FUM-VAR pode ter gerado inflamação nestes receptores no hipocampo de animais adolescentes. É importante ressaltar que essa época da vida dos camundongos é marcada pela alta neuroplasticidade e poda sináptica de neurônios pouco ativos. Além disso, o grupo FUM-AGUA apresenta maior quantidade destes receptores em relação ao FUM-VAR, sugerindo que o tratamento com a vareniclina pode ter atenuado os níveis de dopamina na via. Este efeito é observado com significância quando os grupos são separados por sexo (gráfico 8).

Como citado anteriormente, tanto a nicotina quanto a vareniclina provocam efeitos sexo-dependentes. No presente trabalho, machos e fêmeas apresentaram resultados contrastantes. Em relação às fêmeas, os níveis de alfa-7 nos grupos AR-VAR e FUM-ÁGUA são elevados em comparação ao grupo controle, indicando uma possível suprarregulação destes receptores no hipocampo destes animais. O grupo FUM-ÁGUA foi o que apresentou valores mais elevados, indicando que mesmo após dez dias de retirada da nicotina, a suprarregulação está presente em fêmeas adolescentes. Já nos machos, os grupos AR-VAR, FUM-AGUA e FUM-VAR apresentam significativamente menos receptores alfa-7 do que o grupo AR-ÁGUA, sugerindo que, em machos, o tratamento e a exposição podem ter provocado a infrarregulação destes receptores. O grupo FUM-VAR apresenta os menores níveis de alfa-7 em relação a todos os outros grupos, indicando que o tratamento com vareniclina nos animais que foram expostos à nicotina provocou uma potente infrarregulação destes receptores. Estes dados corroboram estudos anteriores que relataram que a vareniclina é mais potente quando co-administrada com a nicotina (COE *et al.*, 2005). A menor quantidade destes receptores na superfície do neurônio diminui as chances de disparos de dopamina na via, e a baixa quantidade de dopamina no hipocampo está relacionada ao comportamento parecido com a ansiedade em ratos (ROSTAMI *et al.*, 2006; Ashabi *et al.*, 2011), evidenciando, assim, o efeito ansiogênico da vareniclina que foi documentado recentemente na literatura (ZACCARELLI-MAGALHÃES *et al.*, 2019).

5.2.3. Efeitos sob DAT e TH

Como citado anteriormente, TH e DAT são duas proteínas que desempenham funções importantes na modulação de dopamina na via meso-corticolímbica. A TH é a enzima precursora da síntese de dopamina (DAUBNER *et al.*, 2011) e a DAT é a proteína de membrana responsável pela captação da dopamina para dentro da célula (CHEN & REITH, 2000), importante para regulação da amplitude e da duração sináptica dopaminérgica.

Neste trabalho, não foi possível observar diferenças significativas de TH entre nenhum dos grupos. Estes dados indicam que a vareniclina não provocou o aumento de TH mesmo após 15 dias de tratamento quando administrada sozinha (AR-VAR) ou após exposição à fumaça (FUM-VAR). Também não foram observadas alterações no conteúdo de

TH 10 dias após o fim da exposição (FUM-ÁGUA) (gráfico 12). Embora o conteúdo de TH no hipocampo destes animais não tenha sido alterado, o conteúdo de DAT sofreu alteração.

Em relação à DAT 55kDa, foi possível observar que os machos dos grupos AR-VAR e FUM-VAR apresentam menor conteúdo de DAT que o grupo FUM-ÁGUA, indicando que houve uma diminuição na expressão de DAT causada pela vareniclina, tanto após ser administrada sozinha, quanto após exposição à nicotina. Além disso, o grupo FUM-VAR apresenta significativamente menores níveis de DAT que o grupo AR-ÁGUA (gráfico 14). Este efeito pode ser explicado pela hipótese de que a própria dopamina presente fora da célula regula diretamente o funcionamento dos seus transportadores (SAUNDERS *et al.*, 2000). No presente trabalho, este efeito foi somente observado em machos.

Em DAT 80kDa, foi possível observar que, mesmo após 10 dias depois da exposição à fumaça ser interrompida, os níveis de DAT ainda estão elevados no grupo FUM-ÁGUA em comparação a FUM-VAR e AR-VAR (gráfico 15), indicando que a vareniclina atenuou os efeitos aditivos da nicotina no hipocampo destes animais, uma vez que regulou os níveis de DAT. Já foi demonstrado anteriormente em um estudo realizado com humanos, que o grupo tratado com vareniclina apresentou maiores taxas de abandono do uso de cigarro em comparação ao placebo (WANG *et al.*, 2009). Em um estudo realizado no nosso laboratório, em que animais adolescentes foram expostos à nicotina através do teste de escolha entre garrafas e subsequentemente tratados com vareniclina, o grupo tratado com vareniclina apresentou menores taxas de preferência por nicotina em relação ao não tratado (Duarte-Pinheiro, 2019), indicando que a vareniclina atenuou os efeitos aditivos gerados pela nicotina, em concordância com o presente trabalho.

Quando separados por sexo, os machos apresentaram diferenças significativas de DAT entre os grupos, semelhantes às observadas em DAT 55kDa. AR-VAR e FUM-VAR apresentaram menores valores em relação aos grupos AR-ÁGUA e FUM-ÁGUA. Este conjunto de dados sugere que, durante a adolescência, a exposição à nicotina e o tratamento com vareniclina altera os níveis de DAT no hipocampo em machos, mas não em fêmeas. (gráfico 16). Além de já terem sido demonstradas diferenças de sexo na liberação de dopamina no estriado devido ao tabagismo (COSGROVE *et al.*, 2014), também foi demonstrado anteriormente que homens apresentam maiores níveis de liberação de dopamina no estriado em comparação às mulheres em resposta ao teste do desafio da anfetamina (MUNRO *et al.*, 2006) e à ingestão de álcool (URBAN *et al.*, 2010).

Por fim, estes estudos sugerem que, nos homens, abordar os efeitos recompensadores das drogas pode ser um alvo terapêutico mais importante do que nas mulheres.

CONCLUSÕES

- A exposição crônica à fumaça de cigarro durante onze dias não afetou os níveis de receptores colinérgicos nicotínicos, de tirosina hidroxilase e de DAT no hipocampo de animais adolescentes.
- O tratamento com vareniclina após a exposição à fumaça aumentou os níveis da subunidade alfa-4, mas não os de beta-2 no hipocampo de fêmeas adolescentes.
- A vareniclina promoveu a infrarregulação da subunidade alfa-7 no hipocampo de animais previamente expostos à fumaça de cigarro.
- A vareniclina não afetou os níveis de TH no hipocampo, mesmo após quinze dias de tratamento.
- O tratamento com vareniclina atenuou os níveis de DAT no hipocampo em ambos os sexos.
- A exposição à fumaça de cigarro e o tratamento com vareniclina alterou os níveis de DAT no hipocampo de machos, mas não de fêmeas.

REFERÊNCIAS

- ABATE, Cory; SMITH, John A.; JOH, Tong H. Characterization of the catalytic domain of bovine adrenal tyrosine hydroxylase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 151, n. 3, p. 1446-1453, 1988.
- ABREU-VILLACA, Yael et al. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol during adolescence leads to short-and long-term modulation of anxiety-like behavior. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 133, n. 1, p. 52-60, 2013.
- ABREU-VILLAÇA, Yael et al. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. **Behavioural brain research**, v. 167, n. 1, p. 175-182, 2006.
- ABREU-VILLAÇA, Yael et al. Tobacco and alcohol use during adolescence: interactive mechanisms in animal models. **Biochemical Pharmacology**, v. 144, p. 1-17, 2017.
- ABREU-VILLAÇA, Yael et al. Tobacco smoke and ethanol during adolescence: Both combined-and single-drug exposures lead to short-and long-term disruption of the serotonergic system in the mouse brain. **Brain Research Bulletin**, v. 146, p. 94-103, 2019.
- ABREU-VILLAÇA, Yael et al. Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 10, p. 1693-1703, 2015.
- ADRIANI, Walter et al. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 212-224, 2002.
- ADRIANI, Walter; CHIAROTTI, Flavia; LAVIOLA, Giovanni. Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. **Behavioral neuroscience**, v. 112, n. 5, p. 1152, 1998.
- ADRIANI, Walter; LAVIOLA, Giovanni. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 2, p. 334-346, 2000.
- ADRIANI, Walter; LAVIOLA, Giovanni. Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice. **Behavioral neuroscience**, v. 117, n. 4, p. 695, 2003.
- AHN, Jung-Hyuck et al. Protein kinase C-dependent dephosphorylation of tyrosine hydroxylase requires the B56 δ heterotrimeric form of protein phosphatase 2A. **PLoS one**, v. 6, n. 10, p. e26292, 2011.

ALBERT, Dustin; STEINBERG, Laurence. Peer influences on adolescent risk behavior. In: **Inhibitory control and drug abuse prevention**. Springer, New York, NY, 2011. p. 211-226.

ALBUQUERQUE, Edson X. et al. Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 757, p. 48-72, 1995.

ALIANÇA DE CONTROLE DO TABAGISMO (ACT). Infográfico: **O impacto do tabagismo e as estratégias das empresas de tabaco**. 2021. Disponível em: https://actbr.org.br/post/infografico-o-impacto-do-tabagismo-e-as-estrategias-das-empresas-de-tabaco/18878/?utm_source=infografico_tabaco_google_ads&utm_medium=infografico_tabaco_google_ads_act&utm_campaign=infografico_tabaco_google_ads_act_lancamento&gclid=CjwKCAjwz_WGBhA1EiwAUAxIcesilPRBv8fQIUku6NGsZF-j_wLc6MDw_sQ-xfdz91NKub9DbIbqUhoCn38QAvD_BwE Acesso em: 01 Jul. 2021.

ALKONDON, Manickavasagom et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates γ -aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 3, p. 1396-1411, 1997.

ALKONDON, Manickavasagom; ALBUQUERQUE, Edson X. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. **Progress in brain research**, v. 145, p. 109-120, 2004.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Tabaco: qual é o custo para você? O tabagismo pode lhe custar mais do que dinheiro. 2018. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/cancer-control/pt/booklets-flyers/tobacco-what-is-it-costing-you-portuguese.pdf> Acesso em: 04 Jul. 2021.

AMERICAN LUNG ASSOCIATION. What's In a Cigarette? 2020. Disponível em: <https://www.lung.org/quit-smoking/smoking-facts/whats-in-a-cigarette>

AMOS, Amanda et al. Ambivalence and uncertainty: experiences of and attitudes towards addiction and smoking cessation in the mid-to-late teens. **Health Education Research**, v. 21, n. 2, p. 181-191, 2006.

ANTHENELLI, Robert M. et al. Neuropsychiatric safety and efficacy of varenicline, bupropion, and nicotine patch in smokers with and without psychiatric disorders (EAGLES): a double-blind, randomised, placebo-controlled clinical trial. **The Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2507-2520, 2016.

APPERSON, George Latimer. **The social history of smoking**. M. Secker, 1914.

ARIAS, Hugo R. Is the inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by bupropion involved in its clinical actions?. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 11, p. 2098-2108, 2009.

ARY, Dennis V. et al. Development of adolescent problem behavior. **Journal of abnormal child psychology**, v. 27, n. 2, p. 141-150, 1999.

ASHABI, Ghorbangol et al. The effects of hippocampal opioidergic and septal GABAergic system interactions on anxiety-like behavior in rats. **Life sciences**, v. 89, n. 21-22, p. 821-826, 2011.

AVEYARD, Paul; WEST, Robert. Managing smoking cessation. **Bmj**, v. 335, n. 7609, p. 37-41, 2007.

BAILEY, Steffani R. et al. Efficacy and tolerability of pharmacotherapies to aid smoking cessation in adolescents. **Pediatric Drugs**, v. 14, p. 91-108, 2012.

BALFOUR, David JK. The neuronal pathways mediating the behavioral and addictive properties of nicotine. **Nicotine Psychopharmacology**, p. 209-233, 2009.

BANCROFT, Angus et al. "It's like an addiction first thing... afterwards it's like a habit": daily smoking behaviour among people living in areas of deprivation. **Social science & medicine**, v. 56, n. 6, p. 1261-1267, 2003.

BARIK, Jacques; WONNACOTT, Susan. Indirect modulation by $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors of noradrenaline release in rat hippocampal slices: interaction with glutamate and GABA systems and effect of nicotine withdrawal. **Molecular pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 618-628, 2006.

BAVA, Sunita; TAPERT, Susan F. Adolescent brain development and the risk for alcohol and other drug problems. **Neuropsychology review**, v. 20, n. 4, p. 398-413, 2010.

Bell K. A., Shim H., Chen C. K. and McQuiston A. R. (2011) Nicotinic excitatory postsynaptic potentials in hippocampal CA1 interneurons are predominantly mediated by nicotinic receptors that contain $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits. **Neuropharmacology** 61, 1379–1388.

BENOIT-MARAND, M.; JABER, M.; GONON, F. Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 2985-2992, 2000.

BENOIT-MARAND, Marianne; O'DONNELL, Patricio. D2 dopamine modulation of corticoaccumbens synaptic responses changes during adolescence. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1364-1372, 2008.

BENOWITZ, Neal L. Nicotine addiction. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 24, p. 2295-2303, 2010.

BENOWITZ, Neal L. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 49, p. 57-71, 2009.

BENZONI, Girolamo. The History of the New World. In: **The History of the New World**. Penn State University Press, 2021.

BERGINK, Veerle; VAN MEGEN, Harold JGM; WESTENBERG, Herman GM. Glutamate and anxiety. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 175-183, 2004.

BERRETTINI, Wade H.; LERMAN, Caryn E. Pharmacotherapy and pharmacogenetics of nicotine dependence. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1441-1451, 2005.

BJÖRKLUND, Anders; DUNNETT, Stephen B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 194-202, 2007.

BLAKEMORE, Sarah-Jayne. Imaging brain development: the adolescent brain. **Neuroimage**, v. 61, n. 2, p. 397-406, 2012.

BODISON, Stefanie C.; COLBY, John B.; SOWELL, Elizabeth R. Structural brain development: Birth through adolescence. In: **Neural Circuit and Cognitive Development**. Academic Press, 2020. p. 289-317.

BOYD, Norman D. Two distinct kinetic phases of desensitization of acetylcholine receptors of clonal rat PC12 cells. **The Journal of Physiology**, v. 389, n. 1, p. 45-67, 1987.

Brasil. Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA). 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/mdh/pt-br/centrais-de-conteudo/crianca-e-adolescente/estatuto-da-crianca-e-do-adolescente-versao-2019.pdf> Acesso em 27 Jul. 2021.

BREESE, Charles R. et al. Comparison of the regional expression of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ mRNA and [125I]- α -bungarotoxin binding in human postmortem brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 387, n. 3, p. 385-398, 1997.

BRENHOUSE, Heather C.; ANDERSEN, Susan L. Developmental trajectories during adolescence in males and females: a cross-species understanding of underlying brain changes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 8, p. 1687-1703, 2011.

Breslau, N., Peterson, E.L., 1996. Smoking cessation in young adults: age at initiation of cigarette smoking and other suspected influences. **Am. J. Public Health** 86, 214–220.

BRESLAU, Naomi; PETERSON, Edward L. Smoking cessation in young adults: age at initiation of cigarette smoking and other suspected influences. **American journal of public health**, v. 86, n. 2, p. 214-220, 1996.

BROIDE, R. S. et al. Developmental expression of $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor messenger RNA in rat sensory cortex and thalamus. **Neuroscience**, v. 67, n. 1, p. 83-94, 1995.

BROOKS, Jerome E. The Mighty Leaf: Tobacco Through the Ages. **London: Alvin Redman**, 1953.

BUCHANAN, R. A Short History of Tobacco: the Most Provocative Herb. **The Herb Companion**, October/November, pp. 34-38. 1994.

BURNETT, Stephanie; BLAKEMORE, Sarah-Jayne. The development of adolescent social cognition. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1167, n. 1, p. 51-56, 2009.

CADONI, Cristina; DI CHIARA, Gaetano. Differential changes in accumbens shell and core dopamine in behavioral sensitization to nicotine. **European journal of pharmacology**, v. 387, n. 3, p. R23-R25, 2000.

CAHILL, Kate et al. Pharmacological interventions for smoking cessation: an overview and network meta-analysis. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 5, 2013.

CAHILL, Larry. Why sex matters for neuroscience. **Nature reviews neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 477-484, 2006.

CAHN, Zachary; SIEGEL, Michael. Electronic cigarettes as a harm reduction strategy for tobacco control: a step forward or a repeat of past mistakes?. **Journal of public health policy**, v. 32, n. 1, p. 16-31, 2011.

CALABRESI, Paolo et al. New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 8, p. 811-821, 2013.

CARMO, Juliana Teixeira do; PUEYO, Antonio Andrés. A adaptação ao português do Fagerström test for nicotine dependence (FTND) para avaliar a dependência e tolerância à nicotina em fumantes brasileiros. **Rev Bras Med**, v. 59, n. 1/2, p. 73-80, 2002.

CARPENTER, Matthew J. et al. Menstrual cycle phase effects on nicotine withdrawal and cigarette craving: a review. **Nicotine & tobacco research**, v. 8, n. 5, p. 627-638, 2006.

CASEY, B. J.; JONES, RM Y. HARE; TODD, Hare. TA (2008). The adolescent brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1124, n. 1, p. 111-126.

CASEY, Betty Jo; GETZ, Sarah; GALVAN, Adriana. The adolescent brain. **Developmental review**, v. 28, n. 1, p. 62-77, 2008.

CDC, 2020. Youth and Tobacco Use. Disponível em: https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/youth_data/tobacco_use/index.htm
Acesso em: 22 Ago 2021.

Cengelli S, O'Loughlin J, Lauzon B, et al A systematic review of longitudinal population-based studies on the predictors of smoking cessation in adolescent and young adult smokers. **Tobacco Control** 2012;21:355-362.

CENGELLI, Semanur et al. A systematic review of longitudinal population-based studies on the predictors of smoking cessation in adolescent and young adult smokers. **Tobacco control**, v. 21, n. 3, p. 355-362, 2012.

CHANGEUX, Jean-Pierre; DEVILLERS-THIERY, Anne; CHEMOUILLI, Phillippe. Acetylcholine receptor: an allosteric protein. **Science**, v. 225, n. 4668, p. 1335-1345, 1984.

CHEN, Jiajian et al. Age of smoking initiation: implications for quitting. **Health reports-statistics Canada**, v. 9, p. 39-48, 1998.

CHEN, Nianhang; REITH, Maarten EA. Structure and function of the dopamine transporter. **European journal of pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 329-339, 2000.

CILIAUX, Brian J. et al. The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 1714-1723, 1995.

CLARKE, P. B. et al. Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 246, n. 2, p. 701-708, 1988.

CODIGNOLA, A. et al. Serotonin release and cell proliferation are under the control of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in small-cell lung carcinoma cell lines. **FEBS letters**, v. 342, n. 3, p. 286-290, 1994.

Coe JW, Brooks PR, Vetelino MG, et al. 2005. Varenicline: an $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. **J Med Chem**, 48:3474–7.

COHEN, Ami; GEORGE, Olivier. Animal models of nicotine exposure: relevance to second-hand smoking, electronic cigarette use, and compulsive smoking. **Frontiers in psychiatry**, v. 4, p. 41, 2013.

Colombo, Cristóvão. Diario de a bordo – Llegada, 1492. Disponível em: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/PesquisaObraForm.do?select_action=&co_autor=1941 Acesso em: 23 Mar 2021.

COLOMBO, Cristóvão. Diario de a bordo – Llegada, 1492. Disponível em: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/PesquisaObraForm.doselect_action=&co_autor=1941. Acesso em: 23 Mar 2021.

CORNEILLE, Thomas. Dictionnaire des arts et des sciences (2 vol.). Paris: JB Coig-nard, v. 1694, 1964.

CORRIGALL, William A.; COEN, Kathleen M. Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 4, p. 473-478, 1989.

CORRIGALL, William A.; COEN, Kathleen M.; ADAMSON, K. Laurel. Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. **Brain research**, v. 653, n. 1-2, p. 278-284, 1994.

Corringer PJ, Bertrand S, Bohler S, Edelstein SJ, Changeux JP, Bertrand D (1998) Critical elements determining diversity in agonist binding and desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **J Neurosci** 18:648–657.

COSGROVE, Kelly P. et al. Sex differences in the brain's dopamine signature of cigarette smoking. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 50, p. 16851-16855, 2014.

COYLE, J. T.; AXELROD, J. Tyrosine hydroxylase in rat brain: developmental characteristics. **Journal of neurochemistry**, v. 19, n. 4, p. 1117-1123, 1972.

DAHL, Ronald E. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1021, n. 1, p.1-22,2004.

DAHLSTROM, A. al. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta physiol. scand.**, v. 62, n. 232, p. 1-55, 1964.

DAJAS-BAILADOR, Federico; WONNACOTT, Susan. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. **Trends in pharmacological sciences**, v. 25, n. 6, p. 317-324, 2004.

DANI JA, HEINEMANN S. **Molecular and cellular aspects of nicotine abuse.** *Neuron*. 1996;16:905–8.

DANI, John A.; BALFOUR, David JK. Historical and current perspective on tobacco use and nicotine addiction. **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 7, p. 383-392, 2011.

DANI, John A.; BERTRAND, Daniel. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p. 699-729, 2007.

DANI, John A.; DE BIASI, Mariella. Cellular mechanisms of nicotine addiction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 70, n. 4, p. 439-446, 2001.

DANI, John A.; HEINEMANN, Steve. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. **Neuron**, v. 16, n. 5, p. 905-908, 1996.

DANIELSON, Kirsty; TRUMAN, Penelope; KIVELL, Bronwyn M. The effects of nicotine and cigarette smoke on the monoamine transporters. **Synapse**, v. 65, n. 9, p. 866-879, 2011.

DARVILLE, Audrey; HAHN, Ellen J. E-cigarettes and atherosclerotic cardiovascular disease: what clinicians and researchers need to know. **Current atherosclerosis reports**, v. 21, n. 5, p. 1-8, 2019.

DAS, Jai K. et al. Interventions for adolescent mental health: an overview of systematic reviews. **Journal of Adolescent Health**, v. 59, n. 4, p. S49-S60, 2016.

DAUBNER, S. Colette; LE, Tiffany; WANG, Shanzhi. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, n. 1, p. 1-12, 2011.

de Oliveira, Fernanda; Costa, Maria Cristina F. Dossiê técnico: Cultivo de Fumo (*Nicotiana tabacum* L.). **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (SBRT)**, Universidade de São Paulo – USP. Fev. 2012. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTcwMg==#:~:text=A%20folha%20seca%20da%20planta,et%20al.%2C%202007>). Acesso em: 25 Mar. 2021.

DENERIS, Evan S. et al. Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 12, p. 34-40, 1991. Sargent PB (1993) The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16:403–443.

DI CHIARA, Gaetano et al. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 227-241, 2004.

DIAS, Natália Martins; MENEZES, Amanda; SEABRA, Alessandra Gotuzo. Alterações das funções executivas em crianças e adolescentes. **Estudos interdisciplinares em Psicologia**, v. 1, n. 1, p. 80-95, 2010.

DiFranza, J.R., Lew, R.A., 1995. Effect of maternal cigarette smoking on pregnancy complications and sudden infant death syndrome. **Eur. J. Gen. Pract.** 1, 117–117.

DIFRANZA, Joseph R. et al. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. **Tobacco control**, v. 9, n. 3, p. 313-319, 2000.

DIFRANZA, Joseph R.; LEW, Robert A. Effect of maternal cigarette smoking on pregnancy complications and sudden infant death syndrome. **The European Journal of General Practice**, v. 1, n. 3, p. 117-117, 1995.

DINELEY, Kelly T.; PANDYA, Anshul A.; YAKEL, Jerrel L. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 36, n. 2, p. 96-108, 2015.

DOURA, Menahem B. et al. Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. **Brain research**, v. 1215, p. 40-52, 2008.

DREW, Allison E.; DERBEZ, Alicia E.; WERLING, Linda L. Nicotinic receptor-mediated regulation of dopamine transporter activity in rat prefrontal cortex. **Synapse**, v. 38, n. 1, p. 10-16, 2000.

DRISDEL, Renaldo C.; GREEN, William N. Neuronal α -bungarotoxin receptors are α 7 subunit homomers. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 133-139, 2000.

DRZEWIECKI, Carly M.; JURASKA, Janice M. The structural reorganization of the prefrontal cortex during adolescence as a framework for vulnerability to the environment. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 199, p. 173044, 2020.

DUMONTHEIL, Iroise. Adolescent brain development. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 10, p. 39-44, 2016.

DUTRA-TAVARES, Ana Carolina et al. Does nicotine exposure during adolescence modify the course of schizophrenia-like symptoms? Behavioral analysis in a phencyclidine-induced mice model. **Plos one**, v. 16, n. 9, p. e0257986, 2021.

DWYER, Jennifer B.; BROIDE, Ron S.; LESLIE, Frances M. Nicotine and brain development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 84, n. 1, p. 30-44, 2008.

EBBERT JO, Wyatt KD, Hays JT, Klee EW, Hurt RD. Vareniclina para parar de fumar: eficácia, segurança, e recomendações de tratamento and treatment recommendations. **Patient Prefer Adherence**. 2010; 5(4): 355-62.

ELDERS, M. Joycelyn. **Preventing tobacco use among young people: a report of the Surgeon General**. Diane Publishing, 1997.

Encyclopédie du tabac et des fumeurs, Paris, Editions du Temps, 1975, 4to, pp. 512, illus., Fr.250.00. Medical History. Cambridge University Press; 1977;21(1):109–

ERWIN, B.L.; SLATON, R.M. Varenicline in the treatment of alcohol use disorders. **Annals of Pharmacotherapy**, 2014.

EVERETT, Sherry A. et al. Initiation of cigarette smoking and subsequent smoking behavior among US high school students. **Preventive medicine**, v. 29, n. 5, p. 327-333, 1999.

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

FARERI, Dominic S.; MARTIN, Laura N.; DELGADO, Mauricio R. Reward-related processing in the human brain: developmental considerations. **Development and psychopathology**, v. 20, n. 4, p. 1191-1211, 2008.

FELDMAN, Daniel E.; BARRES, Barbara A. Teaching Neuroscience. **Neuron**, v. 18, n. 2, p. 191-192, 1997.

Fenster CP, Rains MF, Noerager B, Quick MW, Lester RA (1997) Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. **J Neurosci** 17:5747–5759.

FERRIS, Craig F.; SHTIEGMAN, Keren; KING, Jean A. Voluntary ethanol consumption in male adolescent hamsters increases testosterone and aggression. **Physiology & behavior**, v. 63, n. 5, p. 739-744, 1998.

FIEDLER, Eric P.; MARKS, Michael J.; COLLINS, Allan C. Postnatal development of two nicotinic cholinergic receptors in seven mouse brain regions. **International journal of developmental neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 533-540, 1990.

FIORE, Michael. **Treating tobacco use and dependence: 2008 update: clinical practice guideline**. Diane Publishing, 2009.

FLAY, Brian R. et al. Cigarette smoking: Why young people do it and ways of preventing it. **Pediatric and adolescent behavioral medicine**, v. 10, p. 132-183, 1983.

Flores C. M., Rogers S. W., Pabreza L. A., Wolfe B. B. and Kellar K. J.(1992) A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alfa 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. **Mol. Pharmacol.**41,31–37.

FLORES, Christopher M. et al. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alfa 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. **Molecular pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 31-37, 1992.

FLORES-BARRERA, Eden et al. Late adolescent expression of GluN2B transmission in the prefrontal cortex is input-specific and requires postsynaptic protein kinase A and D1 dopamine receptor signaling. **Biological psychiatry**, v. 75, n. 6, p. 508-516, 2014.

FLORESCO, Stan B. The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. **Annual review of psychology**, v. 66, p. 25-52, 2015.

FOLDSJ. A base neurológica para o tratamento com agonista parcial da dependência da nicotina: vareniclina. **Journal of Clinical Practice**. 2006; 60(5): 571-576.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/BC/visualize> Acesso em: 03 Jul. 2021.

FOULKES, Lucy; BLAKEMORE, Sarah-Jayne. Studying individual differences in human adolescent brain development. **Nature neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 315-323, 2018.

FREED, Curt et al. Dopamine transporter immunoreactivity in rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 359, n. 2, p. 340-349, 1995.

FREEDMAN, Robert; GOLDOWITZ, Dan. Studies on the hippocampal formation: From basic development to clinical applications: Studies on schizophrenia. **Progress in neurobiology**, v. 90, n. 2, p. 263-275, 2010.

GAINETDINOV, Raul R. et al. Re-evaluation of the role of the dopamine transporter in dopamine system homeostasis. **Brain Research Reviews**, v. 26, n. 2-3, p. 148-153, 1998.

GALVAN, Adriana et al. Earlier development of the accumbens relative to orbitofrontal cortex might underlie risk-taking behavior in adolescents. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 25, p. 6885-6892, 2006.

GALVAN, Adriana. Adolescent development of the reward system. **Frontiers in human neuroscience**, p. 6, 2010.

GARRIDO, A. González; VELÁZQUEZ, FR Gómez. Aspectos neurofisiológicos y psicológicos del consumo del tabaco. **Anuario de investigación en adicciones**, v. 5, n. 1, 2015.

GARRIDO, Rosario et al. Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1395-1403, 2001.

GATELY, Iain. **Tobacco: a cultural history of how an exotic plant seduced civilization**. Open Road+ Grove/Atlantic, 2007.

GIEDD, Jay N. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. **Annals of the new York Academy of Sciences**, v. 1021, n. 1, p. 77-85, 2004.

GINIATULLIN, Rashid; NISTRINI, Andrea; YAKEL, Jerrel L. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. **Trends in neurosciences**, v. 28, n. 7, p. 371-378, 2005.

GLANTZ, Stanton A. et al. (Ed.). **The cigarette papers**. Univ of California Press, 1998.

GODDINGS, Anne-Lise et al. Understanding the role of puberty in structural and functional development of the adolescent brain. **Journal of Research on Adolescence**, v. 29, n. 1, p. 32-53, 2019.

GOGTAY, Nitin et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 8174-8179, 2004.

GOODMAN, E. GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica/editores responsáveis, Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Bjorn C. Knollmann; [tradução da 12. ed. original, Augusto Langeloh... et al; revisão técnica, Almir Lourenço da Fonseca]. Porto Alegre, 2012.

GOODMAN, Jordan; SHERRATT, Andrew; LOVEJOY, Paul E. **Consuming habits: drugs in history and anthropology**. Routledge, 2005.

GOTTLIEB, Scott; ZELLER, Mitchell. A nicotine-focused framework for public health. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 12, p. 1111-1114, 2017.

GRAY, Kevin M. et al. Varenicline versus bupropion XL for smoking cessation in older adolescents: a randomized, double-blind pilot trial. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 14, n. 2, p. 234-239, 2012.

HART, Carl; KSIR, Charles. Nicotine effects on dopamine clearance in rat nucleus accumbens. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 1, p. 216-221, 1996.

HENNINGFIELD, Jack E. et al. Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. **Drug and alcohol dependence**, v. 33, n. 1, p. 23-29, 1993..

HILL, John. Cautions against the immoderate use of snuff. Founded on the known qualities of the tobacco plant; and the effects it must produce when this way taken into the body. **R. Baldwin; J. Jackson, 1761**.

HIND, D. et al. Varenicline in the management of smoking cessation: a single technology appraisal. **Health Technol Assess**, v. 13, n. S2, p. 9-13, 2009.

HÖKFELT, T. et al. Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain. I. Tyrosine hydroxylase in the mes- and diencephalon. **Medical biology**, v. 54, n. 6, p. 427-453, 1976.

HORTENSE, Flávia Tatiana Pedrolo; CARMAGNANI, Maria Isabel Sampaio; BRÊTAS, Ana Cristina Passarella. O significado do tabagismo no contexto do câncer de laringe. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 24-30, 2008.

HSU, Yea-Nan et al. Sustained nicotine exposure differentially affects $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 2, p. 667-675, 1996.

HUCHO, Ferdinand; CHANGEUX, Jean-Pierre. Molecular weight and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from *Electrophorus electricus* electric tissue. **FEBS letters**, v. 38, n. 1, p. 11-15, 1973.

HUKKANEN, Janne; JACOB, Pleyton; BENOWITZ, Neal L. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 1, p. 79-115, 2005.

HUNT, S.; SCHMIDT, J. The relationship of α -bungarotoxin binding activity and cholinergic termination within the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 585-592, 1979.

HURST, Raymond; ROLLEMA, Hans; BERTRAND, Daniel. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. **Pharmacology & therapeutics**, v. 137, n. 1, p. 22-54, 2013.

Instituto Nacional De Câncer, Ministério Da Saúde (INCA). 2019. Tabaco ou saúde. **Manual de orientações, dia nacional de combate ao fumo**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/manuais/manual-dia-nacional-de-combate-ao-fumo>
Acesso em: 07 Ago 2021.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Doenças **relacionadas ao tabagismo**. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/doencas-relacionadas-ao-tabagismo> Acesso em: 01 Jul. 2021a.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Programa Nacional de Controle do Tabagismo. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. Acesso em 06 jun. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/programa-nacional-de-controle-do-tabagismo>

IVERSEN, Susan D.; IVERSEN, Leslie L. Dopamine: 50 years in perspective. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 188-193, 2007.

IYANIWURA, Timothy T.; WRIGHT, Adèle E.; BALFOUR, David J. Evidence that mesoaccumbens dopamine and locomotor responses to nicotine in the rat are influenced by pretreatment dose and strain. **Psychopharmacology**, v. 158, n. 1, p. 73-79, 2001.

JARVIS, Martin J.; MCINTYRE, Doreen; BATES, Clive. Effectiveness of smoking cessation initiatives: Efforts must take into account smokers' disillusionment with smoking and their delusions about stopping. **BMJ: British Medical Journal**, v. 324, n. 7337, p. 608, 2002.

JEFFERIS, Barbara et al. Cigarette consumption and socio-economic circumstances in adolescence as predictors of adult smoking. **Addiction**, v. 98, n. 12, p. 1765-1772, 2003.

JIMÉNEZ-RUIZ, Carlos; BERLIN, Ivan; HERING, Thomas. Varenicline. **Drugs**, v. 69, n. 10, p. 1319-1338, 2009.

JORENBY, Douglas E. et al. Efficacy of varenicline, an $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 296, n. 1, p. 56-63, 2006.

KANDEL, Denise B.; CHEN, Kevin. Extent of smoking and nicotine dependence in the United States: 1991–1993. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 2, n. 3, p. 263-274, 2000.

KANDEL, Denise B.; CHEN, Kevin. Extent of smoking and nicotine dependence in the United States: 1991–1993. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 2, n. 3, p. 263-274, 2000.

KARLIN, Arthur. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 102-114, 2002.

KATCHER, Brian S. Benjamin Rush's educational campaign against hard drinking. **American Journal of Public Health**, v. 83, n. 2, p. 273-281, 1993. Disponível em: <https://ajph.aphapublications.org/doi/pdf/10.2105/AJPH.83.2.273>

Katz B, Thesleff S (1957) A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. **J Physiol (Lond)** 138:63–80.

Khuder, S.A., Dayal, H.H., Mutgi, A.B., 1999. Age at smoking onset and its effect on smoking cessation. **Addict. Behav.** 24, 673–677.

KHUDER, Sadik A.; DAYAL, Hari H.; MUTGI, Anand B. Age at smoking onset and its effect on smoking cessation. **Addictive behaviors**, v. 24, n. 5, p. 673-677, 1999.

Kim Y, Myung SK, Jeon YJ, et al. Effectiveness of pharmacologic therapy for smoking cessation in adolescent smokers: meta-analysis of randomized controlled trials. **Am J Health Syst Pharm.** 2011; 68(3):219–226.

KISHORE, Kamal. Monograph of tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Indian Journal of Drugs**, v. 2, n. 1, p. 5-23, 2014.

KRUGER, Nicholas J. The Bradford method for protein quantitation. **The protein protocols handbook**, p. 17-24, 2009.

KOOB, George F.; LE MOAL, Michel. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 97-129, 2001.

LANGE-ASSCHENFELDT, Christian et al. Effects of varenicline on alfa4-containing nicotinic acetylcholine receptor expression and cognitive performance in mice. **Neuropharmacology**, v. 107, p. 100-110, 2016.

LANGONE, John J.; GJIKA, Hilda B.; VAN VUNAKIS, Helen. Nicotine and its metabolites. Radioimmunoassays for nicotine and cotinine. **Biochemistry**, v. 12, n. 24, p. 5025-5030, 1973.

LEBEL, Catherine; BEAULIEU, Christian. Longitudinal development of human brain wiring continues from childhood into adulthood. **Journal of neuroscience**, v. 31, n. 30, p. 10937-10947, 2011.

LÉNA, Clément; CHANGEUX, Jean-Pierre. Allosteric nicotinic receptors, human pathologies. **Journal of physiology-Paris**, v. 92, n. 2, p. 63-74, 1998.

LENROOT, Rhoshel K. et al. Sexual dimorphism of brain developmental trajectories during childhood and adolescence. **Neuroimage**, v. 36, n. 4, p. 1065-1073, 2007.

LEONARDI-BEE, Jo; JERE, Mirriam Lisa; BRITTON, John. Exposure to parental and sibling smoking and the risk of smoking uptake in childhood and adolescence: a systematic review and meta-analysis. **Thorax**, v. 66, n. 10, p. 847-855, 2011.

Lester RA, Dani JA (1995) Acetylcholine receptor desensitization induced by nicotine in rat medial habenula neurons. **J Neurophysiol** 74:195–206.

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

LEVENTHAL, Howard; CLEARY, Paul D. The smoking problem: a review of the research and theory in behavioral risk modification. **Psychological bulletin**, v. 88, n. 2, p. 370, 1980.

LEVIN, Edward D.; MCCLERNON, F. Joseph; REZVANI, Amir H. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. **Psychopharmacology**, v. 184, n. 3, p. 523-539, 2006.

LEWIS, David A. et al. Dopamine and the neural circuitry of primate prefrontal cortex: implications for schizophrenia research. **Neuropsychopharmacology**, 1992.

LITTLE, Hilary J. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. **Alcohol Research & Health**, v. 24, n. 4, p. 215, 2000.

LONGENECKER, Gesina L. Drogas: ações e reações. In: Drogas: ações e reações. 2002. p. 121-121.

LUKAS, Ronald J. Effects of chronic nicotinic ligand exposure on functional activity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the PC12 rat pheochromocytoma or the TE671/RD human clonal line. **Journal of neurochemistry**, v. 56, n. 4, p. 1134-1145, 1991.

LUNA, Beatriz et al. An integrative model of the maturation of cognitive control. **Annual review of neuroscience**, v. 38, p. 151, 2015.

LYNCH, Wendy J.; ROTH, Megan E.; CARROLL, Marilyn E. Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. **Psychopharmacology**, v. 164, n. 2, p. 121-137, 2002.

MACRÌ, Simone et al. Risk taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. **Animal Behaviour**, v. 64, n. 4, p. 541-546, 2002.

MANSVELDER, Huibert D.; MCGEHEE, Daniel S. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. **Journal of neurobiology**, v. 53, n. 4, p. 606-617, 2002.

MARKS, Michael J.; BURCH, James B.; COLLINS, ALLAN C. Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 226, n. 3, p. 817-825, 1983.

MARKS, MICHAEL J.; GRADY, SHARON R.; COLLINS, ALLAN C. Downregulation of nicotinic receptor function after chronic nicotine infusion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 266, n. 3, p. 1268-1276, 1993.

MARQUES ACPR, CAMPANA A, GIGLIOTTI AP, LOURENÇO MTC, FERREIRA MCDANIEL, Patricia A.; SMITH, Elizabeth A.; MALONE, Ruth E. The tobacco endgame: a qualitative review and synthesis. **Tobacco Control**, v. 25, n. 5, p. 594-604, 2016.

MCHUGH, Patrick C.; BUCKLEY, David A. The structure and function of the dopamine transporter and its role in CNS diseases. **Vitamins & Hormones**, v. 98, p. 339-369, 2015.

MCNEILL, ANN D. The development of dependence on smoking in children. **British journal of addiction**, v. 86, n. 5, p. 589-592, 1991.

MEIRELLES, R.H.S., GONÇALVES, C.M.C., 2004. **Abordagem Cognitivo - Comportamental do Fumante**. In: Diretrizes para Cessação do Tabagismo, Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, DF.

MELLO, Paulo Roberto Bezerra de; PINTO, Gilberto Rodrigues; BOTELHO, Clovis. Influência do tabagismo na fertilidade, gestação e lactação. **Jornal de pediatria**, v. 77, p. 257-264, 2001.

MICHELI, Alfredo de. El tabaco a la luz de la historia y la medicina. **Archivos de cardiología de México**, v. 85, n. 4, p. 318-322, 2015.

MIDDLETON, Lisa S. et al. Nornicotine inhibition of dopamine transporter function in striatum via nicotinic receptor activation. **Synapse**, v. 61, n. 3, p. 157-165, 2007.

MIDDLETON, Lisa S.; CASS, Wayne A.; DWOSKIN, Linda P. Nicotinic receptor modulation of dopamine transporter function in rat striatum and medial prefrontal cortex. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 1, p. 367-377, 2004.

MIHALAK, Karla B.; CARROLL, F. Ivy; LUETJE, Charles W. Varenicline is a partial agonist at $\alpha 4\beta 2$ and a full agonist at $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptors. **Molecular pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 801-805, 2006.

MISHRA, A., CHATURVEDI, P., DATTA, S., SINUKUMAR, S., JOSHI, P., & GARG, A. **Harmful effects of nicotine**. Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology, 36(1), 24–31. doi:10.4103/0971-5851.151771 (2015).

MOLINOFF, PERRY B.; AXELROD, JULIUS. Biochemistry of catecholamines. **Annual review of biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 465-500, 1971.

MOORE, R. Y.; BLOOM, F. E. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. **Annual review of neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 113-168, 1979.

MOREIRA, Márcio Dionízio et al. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. **Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: EPAMIG/CTZM**, p. 89-120, 2006.

MOUTINHO, Ana Viale; NUNES, Laura M. **Publicidade, tabaco e estratégias**. 2008.

MUMFORD, Elizabeth A. et al. Nicotine and e-cigarette beliefs and policy support among US smokers and nonsmokers. **Tobacco Regulatory Science**, v. 3, n. 3, p. 293-305, 2017.

MUNRO, Cynthia A. et al. Sex differences in striatal dopamine release in healthy adults. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 10, p. 966-974, 2006.

MUSEO, Enrico; WISE, Roy A. Place preference conditioning with ventral tegmental injections of cytosine. **Life sciences**, v. 55, n. 15, p. 1179-1186, 1994.

NELSON, David E. et al. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. **American Journal of Public Health**, v. 85, n. 1, p. 34-40, 1995.

NESTLER, Eric J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature reviews neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 119-128, 2001.

NEUFANG, Susanne et al. Sex differences and the impact of steroid hormones on the developing human brain. **Cerebral cortex**, v. 19, n. 2, p. 464-473, 2009.

NUTT, David J. et al. Estimating the harms of nicotine-containing products using the MCDA approach. **European addiction research**, v. 20, n. 5, p. 218-225, 2014.

O'DONNELL, Patricio. Adolescent maturation of cortical dopamine. **Neurotoxicity research**, v. 18, n. 3, p. 306-312, 2010.

OADES, Robert D.; HALLIDAY, Glenda M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. **Brain Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 117-165, 1987.

OBACH, R. Scott et al. Metabolism and disposition of varenicline, a selective $\alpha 4\beta 2$ acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. **Drug metabolism and disposition**, v. 34, n. 1, p. 121-130, 2006.

OLIVEIRA, F.; COSTA, M. C. F. Dossiê técnico-cultivo de fumo (*Nicotiana tabacum* L)[Internet]. **São Paulo: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**, 2012. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossietecnico/downloadsDT/NTcwMg==#:~:text=A%20fo%20lha%20seca%20da%20planta,et%20al.%2C%202007>). Acesso em: 25 Mar. 2021.

O'LOUGHLIN, Jennifer L. et al. Incidence and determinants of cigarette smoking initiation in young adults. **Journal of Adolescent Health**, v. 54, n. 1, p. 26-32. e4, 2014.

ORBEN, Amy; TOMOVA, Livia; BLAKEMORE, Sarah-Jayne. The effects of social deprivation on adolescent development and mental health. **The Lancet Child & Adolescent Health**, v. 4, n. 8, p. 634-640, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. TABACO. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/node/4968>> Acesso em 01 Jul. 2021.

ORTELLS, Marcelo O.; ARIAS, Hugo R. Neuronal networks of nicotine addiction. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 12, p. 1931-1935, 2010.

OSPINA, Jose A. et al. Calcium regulation of agonist binding to $\alpha 7$ -type nicotinic acetylcholine receptors in adult and fetal rat hippocampus. **Journal of neurochemistry**, v. 70, n. 3, p. 1061-1068, 1998.

Peng X, Gerzanich V, Anand R, Whiting PJ, Lindstrom J (1994) Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. **Mol Pharmacol** 46:523–530.

PENG, Xiao et al. Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. **Molecular pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 523-530, 1994.

Pfizer Inc. Chanpix (varenicline tartrate) European Medicine Agency. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000699/human_med_000696.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 Acesso em: 02 nov 2022.

PICCIOTTO, Marina R. et al. Acetylcholine receptors containing the $\beta 2$ subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. **Nature**, v. 391, n. 6663, p. 173-177, 1998.

PIDOPLICHKO, Volodymyr I. et al. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. **Nature**, v. 390, n. 6658, p. 401-404, 1997.

PIERCE, John P.; GILPIN, Elizabeth. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes?. **American journal of public health**, v. 86, n. 2, p. 253-256, 1996.

PINHEIRO, C. R. et al. Concurrent maternal and pup postnatal tobacco smoke exposure in Wistar rats changes food preference and dopaminergic reward system parameters in the adult male offspring. **Neuroscience**, v. 301, p. 178-192, 2015.

PIPER, Megan E. Withdrawal: expanding a key addiction construct. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 17, n. 12, p. 1405-1415, 2015.

POLOSA, Riccardo. E-cigarettes: Public Health England's evidence based confusion?. **The Lancet**, v. 386, n. 10000, p. 1237-1238, 2015.

PROCHASKA J, HILTON J. Risk of cardiovascular serious adverse events associated with varenicline use for tobacco cessation: systematic review and meta-analysis. **BMJ** 2012; 344: e2856.

QUIK, Maryka et al. Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization. **Journal of Comparative Neurology**, v. 425, n. 1, p. 58-69, 2000.

RALHO, Ana et al. Effects of electronic cigarettes on oral cavity: a systematic review. **Journal of Evidence Based Dental Practice**, v. 19, n. 4, p. 101318, 2019.

RANG et al. **Rang & dale farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015.

RAW, M. et al. WHO Europe evidence based recommendations on the treatment of tobacco dependence. **Tobacco control**, v. 11, n. 1, p. 44, 2002.

REITER, Edward O.; ROOT, Allen W. Hormonal changes of adolescence. **Medical Clinics of North America**, v. 59, n. 6, p. 1289-1304, 1975.

RIBEIRO-CARVALHO, A. et al. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. **Neuroscience**, v. 162, n. 4, p. 1174-1186, 2009.

RIBEIRO-CARVALHO, Anderson et al. Nicotine and ethanol interact during adolescence: effects on the central cholinergic systems. **Brain research**, v. 1232, p. 48-60, 2008.

RICHMOND-RAKERD, Leah S. et al. Age at first use and later substance use disorder: Shared genetic and environmental pathways for nicotine, alcohol, and cannabis. **Journal of abnormal psychology**, v. 125, n. 7, p. 946, 2016.

RIGOTTI, Nancy A. **Pharmacotherapy for smoking cessation in adults**. 2022. Acesso em: 31 out. 2022. Disponível em: <<https://www.uptodate.com/contents/pharmacotherapy-for-smoking-cessation-in-adults>>

ROBERTS, Megan E.; COLBY, Suzanne M.; JACKSON, Kristina M. What predicts early smoking milestones?. **Journal of Studies on Alcohol and Drugs**, v. 76, n. 2, p. 256-266, 2015.

RODGMAN, Alan; PERFETTI, Thomas A. The chemical components identified in tobacco and tobacco smoke prior to 1954: a chronology of classical chemistry. **Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research**, v. 23, n. 5, p. 277-333, 2009.

ROLLEMA, H. et al. Pharmacological profile of the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline, an effective smoking cessation aid. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 985-994, 2007.

ROLLEMA, Hans et al. Rationale, pharmacology and clinical efficacy of partial agonists of $\alpha 4\beta 2$ nACh receptors for smoking cessation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 28, n. 7, p. 316-325, 2007.

ROMEO, Russell D.; MCEWEN, Bruce S. Stress and the adolescent brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1094, n. 1, p. 202-214, 2006.

RONDINA, Regina de Cássia; GORAYEB, Ricardo; BOTELHO, Clóvis. Características psicológicas associadas ao comportamento de fumar tabaco. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, p. 592-601, 2007.

RONDINA, Regina de Cássia; GORAYEB, Ricardo; BOTELHO, Clovis. Relação entre tabagismo e transtornos psiquiátricos. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 30, p. 221-228, 2003.

ROSEMBERG J. **A poluição pelo fumo do cigarro. Distúrbios provocados nos fumantes involuntários**. Em: Tabagismo, sério problema de saúde pública, São Paulo, 1987.

ROSEMBERG, José. Pandemia do tabagismo: enfoques históricos e atuais. In: **Pandemia do tabagismo: enfoques históricos e atuais**. 2002. p. 184-184.

ROSTAMI, Parvin; HAJZADEH-MOGHADDAM, Akbar; ZARRINDAST, Mohammad-Reza. The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviours. **Physiology & behavior**, v. 87, n. 5, p. 891-896, 2006.

ROTH, Megan E.; COSGROVE, Kelly P.; CARROLL, Marilyn E. Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 6, p. 533-546, 2004.

ROTHWELL, Erin; LAMARQUE, Johnelle. The use of focus groups to compare tobacco attitudes and behaviors between youth in urban and rural settings. **Health Promotion Practice**, v. 12, n. 4, p. 551-560, 2011.

ROWELL, Peter P.; LI, Maureen. Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors. **Journal of neurochemistry**, v. 68, n. 5, p. 1982-1989, 1997.

RUBIO MONTEVERDE, Horacio; RUBIO MAGAÑA, Alessandro. Breves comentarios sobre la historia del tabaco y el tabaquismo. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v. 19, n. 4, p. 297-300, 2006.

SALES, Julianna Mendes et al. Cigarro Eletrônico: Mocinho ou Vilão?. **Revista Estomatológica Herediana**, v. 31, n. 1, p. 28-36, 2021.

SANDERSON, E. M. et al. Upregulation of nicotinic receptors following continuous infusion of nicotine is brain-region-specific. **Brain research**, v. 617, n. 2, p. 349-352, 1993.

SANTOS, Christian Fausto Moraes dos; BRACHT, Fabiano; CONCEIÇÃO, Gisele Cristina da. Esta que " é uma das delícias, e mimos desta terra...": o uso indígena do tabaco (N. rustica e N. tabacum) nos relatos de cronistas, viajantes e filósofos naturais dos séculos XVI e XVII. **Topoi (Rio de Janeiro)**, v. 14, p. 119-131, 2013.

SANTOS-SILVA, A. P. et al. Effects of tobacco smoke exposure during lactation on nutritional and hormonal profiles in mothers and offspring. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 1, p. 75-84, 2011.

SANTOS-SILVA, A. P. et al. Endocrine effects of tobacco smoke exposure during lactation in weaned and adult male offspring. **J Endocrinol**, v. 218, n. 1, p. 13-24, 2013.

SATO, Satoru M. et al. Adolescents and androgens, receptors and rewards. **Hormones and behavior**, v. 53, n. 5, p. 647-658, 2008.

SAUNDERS, Christine et al. Amphetamine-induced loss of human dopamine transporter activity: an internalization-dependent and cocaine-sensitive mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6850-6855, 2000.

SCHWARTZ, Rochelle D.; KELLAR, Kenneth J. In vivo regulation of [3H] acetylcholine recognition sites in brain by nicotinic cholinergic drugs. **Journal of neurochemistry**, v. 45, n. 2, p. 427-433, 1985.

SÉGUÉLA, Philippe et al. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. **Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 2, p. 596-604, 1993.

SILVA, Luiz Carlos Corrêa da et al. Smoking control: challenges and achievements. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, p. 290-298, 2016.

SIMON, Hervé; SCATTON, Bernard; LE MOAL, Michel. Dopaminergic A10 neurones are involved in cognitive functions. **Nature**, v. 286, n. 5769, p. 150-151, 1980.

Sindicato Interestadual da Indústria do Tabaco (SINDITABACO). Sobre o setor. **Origem do tabaco**. 2021. Disponível em: <https://www.sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/origem-do-tabaco/>. Acessado em: 22 de novembro de 2022.

SISK, Cheryl L.; FOSTER, Douglas L. The neural basis of puberty and adolescence. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 1040-1047, 2004.

SLOTKIN, Theodore A. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. **Neurotoxicology and teratology**, v. 24, n. 3, p. 369-384, 2002.

SPEAR, Linda P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 24, n. 4, p. 417-463, 2000.

STEINBERG, Laurence. Risk taking in adolescence: what changes, and why?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1021, n. 1, p. 51-58, 2004.

STERN, Robert A. et al. Stages of adolescent cigarette smoking acquisition: measurement and sample profiles. **Addictive behaviors**, v. 12, n. 4, p. 319-329, 1987.

STOKES, Alan H.; HASTINGS, Teresa G.; VRANA, Kent E. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. **Journal of neuroscience research**, v. 55, n. 6, p. 659-665, 1999.

STOLERMAN, Ian P.; JARVIS, M. J. The scientific case that nicotine is addictive. **Psychopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 2-10, 1995.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Results from the 2013 National Survey on Drug Use and Health: Mental Health Findings, NSDUH Series H-49, HHS Publication No. (SMA) 14-4887. Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2014.

Sudweeks S. N. and Yakel J. L. (2000) Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. **J. Physiol.** 527(Pt 3), 515–528.

TAU, Gregory Z.; PETERSON, Bradley S. Normal development of brain circuits. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 147-168, 2010.

TRAUTH, Jennifer A. et al. Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions. **Brain research**, v. 851, n. 1-2, p. 9-19, 1999.

TRIGO, Miguel. **Cigarros, tabaco e nicotina: Factores biocomportamentais associados ao tabagismo**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa (Portugal).

TSENG, Kuei Y.; O'DONNELL, Patricio. D2 dopamine receptors recruit a GABA component for their attenuation of excitatory synaptic transmission in the adult rat prefrontal cortex. **Synapse**, v. 61, n. 10, p. 843-850, 2007.

TSENG, Kuei Y.; O'DONNELL, Patricio. Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D1–NMDA co-activation. **Cerebral Cortex**, v. 15, n. 1, p. 49-57, 2005.

TUTKA P., MOSIEWICZ J., WIELOSZ M., **Pharmacokinetics and metabolism of nicotine**. *Pharmacological Reports*, v57, p143-153, 2005.

URBAN, Nina BL et al. Sex differences in striatal dopamine release in young adults after oral alcohol challenge: a positron emission tomography imaging study with [¹¹C] raclopride. **Biological psychiatry**, v. 68, n. 8, p. 689-696, 2010.

VALLE, L. et al. *Farmacologia Integrada*, 3ª edição. **Rio de Janeiro, Editora Revinter**, 2007.

VIEGAS, Carlos Alberto de Assis. Formas não habituais de uso do tabaco. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, p. 1069-1073, 2008.

Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

VOLKOW, Nora D. et al. Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. **Molecular psychiatry**, v. 9, n. 6, p. 557-569, 2004.

VON SOEMMERRING, Samuel Thomas. **De morbis vasorum absorbentium corporis humani, sive dissertationis quae praemium retulit Societatis Rheno-Traiectinae anno 1794 pars pathologica: Acc. Index scriptorum de systemate absorbente**. Varrentrapp et Wenner, 1795.

WALTERS, Carrie L. et al. The $\beta 2$ but not $\alpha 7$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. **Psychopharmacology**, v. 184, n. 3, p. 339-344, 2006.

WANG, Chen et al. Varenicline for smoking cessation: a placebo-controlled, randomized study. **Respirology**, v. 14, n. 3, p. 384-392, 2009.

WANG, Hai; SUN, Xiulan. Desensitized nicotinic receptors in brain. **Brain research reviews**, v. 48, n. 3, p. 420-437, 2005.

WEINBERGER, Andrea H. et al. Stability of smoking status in the US population: a longitudinal investigation. **Addiction**, v. 109, n. 9, p. 1541-1553, 2014.

WILKINSON, Anna V. et al. Age-related differences in factors associated with smoking initiation. **Cancer Causes & Control**, v. 18, n. 6, p. 635-644, 2007.

WISE, Roy A. Dopamine, learning and motivation. **Nature reviews neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 483-494, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Tobacco. 2020. Acesso em: 22 nov 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Problemas de salud de la adolescencia: informe de un Comité de Expertos de la OMS [se reunió en Ginebra del 3 al 9 de noviembre de 1964]. 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tobacco. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>>

World Health Organization. **Who Report On The Global Tobacco Epidemic**, 2019. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325968/WHO-NMH-PND-2019.5-eng.pdf?ua=1> Acesso em: 01 Jul. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Classification of Diseases 11th Revision**. The global standard for diagnostic health information. Available at: <https://icd.who.int/en> Access in: 04/06/22.

WÜNSCH FILHO, Victor et al. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 13, p. 175-187, 2010.

YAKEL, Jerrel L. Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 465, n. 4, p. 441-450, 2013.

YAMASHITA, Hiroshi et al. Effect of nicotine on dopamine uptake in COS cells possessing the rat dopamine transporter and in PC12 cells. **Biochemical pharmacology**, v. 49, n. 5, p. 742-745, 1995.

YANG, Yen Kuang et al. Correlation between fine motor activity and striatal dopamine D2 receptor density in patients with schizophrenia and healthy controls. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 123, n. 3, p. 191-197, 2003.

ZACCARELLI-MAGALHÃES, Julia et al. Prolonged exposure of rats to varenicline increases anxiety and alters serotonergic system, but has no effect on memory. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 181, p. 1-8, 2019.

ZARRINDAST, Mohammad-Reza; SADEGH, Marjan; SHAFAGHI, Bijan. Effects of nicotine on memory retrieval in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 295, n. 1, p. 1-6, 1996.

ZHU, Jun; APPARSUNDARAM, Subbu; DWOSKIN, Linda P. Nicotinic receptor activation increases [3H] dopamine uptake and cell surface expression of dopamine transporters in rat prefrontal cortex. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 328, n. 3, p. 931-939, 2009.

ZOR, Tsaffrir; SELINGER, Zvi. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. **Analytical biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 302-308, 1996.