



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Anaís Bandeira Martins

Exposição à nicotina durante a adolescência potencializa o efeito inibitório da racloprida, um antagonista do receptor D2, no comportamento semelhante à psicose induzido pela fenciclidina em camundongos

Rio de Janeiro

2022

Anaís Bandeira Martins

Exposição à nicotina durante a adolescência potencializa o efeito inibitório da racloprida, um antagonista do receptor D2, no comportamento semelhante à psicose induzido pela fenciclidina em camundongos

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.

Orientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça

Coorientadora: Prof.^a Dra. Ana Carolina Dutra Tavares

Rio de Janeiro

2022

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

B214 Bandeira-Martins, Anaís

Exposição à nicotina durante a adolescência potencializa o efeito inibitório da racloprida, um antagonista do receptor D2, no comportamento semelhante à psicose induzido pela fenciclidina em camundongos / Anaís Bandeira Martins. - 2022.

117 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça

Coorientadora: Prof.^a Dra. Ana Carolina Dutra Tavares

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

1. Esquizofrenia – Induzido quimicamente – Teses. 2. Nicotina – Uso terapêutico – Teses. 3. Receptores de dopamina D2 – Efeitos dos fármacos. 4. Desenvolvimento do adolescente – Efeitos dos fármacos. I. Villaça, Yael de Abreu. II. Tavares, Ana Carolina Dutra. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.895-03

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

Anaís Bandeira Martins

Exposição à nicotina durante a adolescência potencializa o efeito inibitório da racloprida, um antagonista do receptor D2, no comportamento semelhante à psicose induzido pela fenciclidina em camundongos

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 27 de maio de 2022.

Orientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Ana Carolina Dutra Tavares
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Marinete Pinheiro Carrera
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Rio de Janeiro
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, Maria, Wagner, Raquel, Ricardo, Alana, Amanda, Alice, Daniel, Mônica, Zé e Felipe por todo o incentivo e ajuda durante todo esse processo, sem vocês não teria conseguido atingir minhas conquistas.

Agradeço minha orientadora Yael por me receber como sua aluna de mestrado e pela ajuda durante os últimos 3 anos. À minha coorientadora Ana, pelos aprendizados, parceria, conselho e principalmente pela amizade.

Agradeço à Luciana e Juliana que fizeram parte desse projeto e me ajudaram durante todo o processo, não teria conseguido sem vocês. E também, um agradecimento especial ao meu amigo Vitor, que me acompanhou em toda a minha trajetória desde o ensino médio e durante o mestrado, que foi minha rocha e me ajudou de tantas formas.

Agradeço a toda a equipe do laboratório que sempre tornaram o trabalho mais agradável, e foram amigos dentro e fora do trabalho.

Agradeço à minha amiga Ludy que esteve do meu lado me trazendo tortas e vendo filme, e também aos meus amigos do cheer, vocês me ofereceram suporte sempre quando precisei.

Finalmente, agradeço aos professores que gentilmente aceitaram compor a minha banca de defesa como titulares, suplentes e revisor: Anderson, Marinete, Penha, Cláudio, Gilda e Alex.

RESUMO

BANDEIRA-MARTINS, Anaís. Exposição à nicotina durante a adolescência potencializa o efeito inibitório da racloprida, um antagonista do receptor D2, no comportamento semelhante à psicose induzido pela fenciclidina em camundongos. 2022. 117 f.

Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O tabagismo apresenta uma associação com pacientes com esquizofrenia que se inicia na adolescência, apresentando uma circuitaria neural em comum. Neste projeto investigamos as bases biológicas da associação entre esquizofrenia e tabagismo. Para isso, fizemos uma pré-exposição a Nicotina em camundongos no período da adolescência utilizando uma minibomba osmótica que liberava Nicotina até o final do teste de aquisição. Em seguida avaliamos a resposta de sensibilização locomotora ao modelo de Fenciclidina de esquizofrenia. E ainda, investigamos o papel do sistema dopaminérgico na sensibilização comportamental, expondo os animais à Racloprida, um antagonista do receptor D2. Os camundongos adolescentes expostos ou não à Nicotina (24mg/Kg/dia) foram levados a um ambiente de campo aberto por 3 dias de habituação (H1-3) e 6 dias de teste (período de aquisição AQ1-6). Durante os testes receberam uma dose de Racloprida diária única (0,5mg/kg, s.c.) ou solução salina seguida de injeções de Fenciclidina (10mg/Kg, s.c.). Os testes de sensibilização foram realizados após uma retirada de 5 dias. Neste teste, os animais receberam um desafio (D) de Fenciclidina ou Nicotina. A ambulação aumentou em resposta à exposição repetida à Fenciclidina durante a AQ e foi aumentada após o desafio com Fenciclidina, evidenciando o desenvolvimento e a expressão de sensibilização locomotora. A Racloprida preveniu o desenvolvimento de sensibilização evocado pela Fenciclidina, porém a exposição prévia, durante AQ, inibiu somente parcialmente a expressão em camundongos desafiados com Fenciclidina. A Nicotina potencializou os resultados inibitórios da Racloprida durante os primeiros dias de AQ e, durante o D, atenuou a expressão da sensibilização evocada pela Fenciclidina. O desafio com Nicotina não teve impacto relevante na locomoção, o que é consistente com a falta de sensibilização cruzada entre Nicotina e Fenciclidina. Em conclusão, nossos resultados mostraram que a Nicotina não piora e pode até melhorar o comportamento psicótico sensibilizado pela Fenciclidina em camundongos adolescentes. Os resultados da associação de Nicotina com a Racloprida apontaram que os receptores D2 desempenham um forte papel nas ações da Fenciclidina e da Nicotina.

Palavras-chave: psicose; tabaco; nicotina; adolescência; sistema dopaminérgico.

ABSTRACT

BANDEIRA-MARTINS, Anaís. **Nicotine Exposure During Adolescence Potentiates the Inhibitory Effect of Raclopride, a D2 Receptor Antagonist, on Phencyclidine-Induced Psychosis-Like Behavior in Mice.** 2022. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Smoking has an association with patients with schizophrenia that begins in adolescence, with a common neural circuitry. In this project we investigated the biological basis of the association between schizophrenia and smoking. In order to this, we performed a pre- exposure to Nicotine in mice in the period of adolescence using a mini osmotic pump that released Nicotine until the end of the acquisition test. Then we evaluated the locomotor sensitization response to the Phencyclidine model of schizophrenia. Furthermore, we investigated the role of the dopaminergic system in behavioral sensitization by exposing animals to Raclopride, a D2 receptor antagonist. Adolescent mice exposed or not to nicotine (24mg/kg/day) were taken to an open field environment for 3 days of habituation (H1-3) and 6 days of testing (acquisition period AQ1-6). During the tests they received a single daily dose of Raclopride (0.5mg/kg, s.c.) or saline solution followed by injections of Phencyclidine (10mg/kg, s.c.). Sensitization tests were performed after a 5-day withdrawal. In this test, the animals received a challenge (D) of Phencyclidine or Nicotine. Ambulation increased in response to repeated Phencyclidine exposure during AQ and was increased after Phencyclidine challenge, evidencing the development and expression of locomotor sensitization. Raclopride prevented the development of Phencyclidine-evoked sensitization, but prior exposure during AQ only partially inhibited expression in Phencyclidine-challenged mice. Nicotine potentiated the inhibitory results of Raclopride during the first days of AQ and, during D, attenuated the expression of Phencyclidine- evoked sensitization. Nicotine challenge had no relevant impact on locomotion, which is consistent with the lack of cross-sensitization between Nicotine and Phencyclidine. In conclusion, our results showed that Nicotine does not worsen and may even improve Phencyclidine-sensitized psychotic behavior in adolescent mice. The results of the association of Nicotine with Raclopride showed that D2 receptors play a strong role in the actions of Phencyclidine and Nicotine.

Keywords: psychosis; tobacco; nicotine; adolescence; dopaminergic system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias dopaminérgicas afetadas na SCHZ	17
Figura 2 - Linha do tempo do projeto	31
Figura 3 - Atividade locomotora dos dias de habituação.....	34
Figura 4 - Atividade locomotora por intervalo de habituação	36
Figura 5 - Atividade locomotora do 1º intervalo da AQ.....	37
Figura 6 - Atividade locomotora do 2º intervalo da AQ.....	38
Figura 7 - Atividade locomotora do 3º intervalo da AQ.....	40
Figura 8 - Atividade locomotora do 4º intervalo da AQ.....	41
Figura 9 - Comparando H com AQ1.....	42
Figura 10 - Atividade locomotora do 1º intervalo AQ1xAQ6.....	44
Figura 11 - Atividade locomotora do 2º intervalo AQ1xAQ6.....	45
Figura 12 - Atividade locomotora do 3º intervalo AQ1xAQ6.....	46
Figura 13 - Atividade locomotora do 4º intervalo AQ1xAQ6.....	47
Figura 14 - Atividade locomotora do desafio 1º e 2º intervalo	48
Figura 15 - Atividade locomotora do desafio de PCP 3º e 4º intervalo	49
Figura 16 - Atividade locomotora do desafio de NIC 3º e 4º intervalo	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais	30
Tabela 2 - Comparação da atividade locomotora de cada intervalo da habituação	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AQ	Aquisição
ATV	Área Tegmental Ventral
CA	Teste de Campo Aberto
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animal
CID-10	Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
CONT	Grupo Controle
CPF	Cortex Pré-Frontal
D	Desafio
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
FPLSD	Posthoc Fisher's Protected Least Significant Difference
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
H	Habituação
HP	Hipocampo
i.p	Intraperitoneal
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
IECS	Instituto de Efetividade Clínica E Sanitária
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MB	Minibomba
NAcc	Núcleo Acumbente
NIC	Nicotina
NMDA	N-Metil D-Aspartato
PCP	Fenciclidina
PET	Tomografia Por Emissão de Pósitrons
PN	Pós-Natal
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PPI	Teste de Inibição pelo Pré-Pulso (Do Inglês Prepulse Inhibition)

RAC	Racloprida
rANOVA	Análises de Variância com Medidas Repetida
s.c	Subcutânea
SAL	Salina
SCHZ	Esquizofrenia
SNC	Sistema Nervoso Central
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
uANOVA	Análise de Variância Univariadas
WHO	Organização Mundial de Saúde (Do Inglês World Health Organization)

LISTA DE SÍMBOLOS

mg/kg/dia	Miligramas por quilogramas por dia
mg/kg	Miligrama por quilograma
°C	Celsius
cm	Centímetros
min	Minuto
nAChRs	Receptor nicotínico de acetilcolina
NaCl	Cloreto de sódio
HCl	Ácido clorídrico
M	Molar
NaOH	Hidróxido de sódio
D1	Receptores dopaminérgicos do tipo 1
D2	Receptores dopaminérgicos do tipo 2
µl	Microlitros

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1	Esquizofrenia	15
1.2	Hipótese dopaminérgica e glutamatérgica	16
1.3	Modelo de schz	19
1.4	Nicotina	20
1.5	Tabagismo e Esquizofrenia	21
1.6	Cérebro adolescente	22
1.7	Automedicação x vulnerabilidade compartilhada	23
1.8	Sensibilização	24
2.	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.1	Objetivos Específicos	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Animais	27
3.2	Preparação das mini-bombas	27
3.3	Cirurgia	28
3.4	Ambiente experimental	28
3.5	Sensibilização locomotora	29
3.6	Linha do tempo	31
3.7	Análise estatística	31
4.	RESULTADOS	33
4.1	Resultado da fase de habituação	33
4.1.1	<u>Dias da Habituação</u>	33
4.1.2	<u>Diferença entre os intervalos</u>	34
4.1.3	<u>Intervalos por dia</u>	35
4.2	Resultado da fase de aquisição	36
4.2.1	<u>Primeiro intervalo da aquisição</u>	37
4.2.2	<u>Segundo intervalo da aquisição</u>	38

4.2.3	<u>Terceiro intervalo da aquisição</u>	39
4.2.4	<u>Quarto intervalo da aquisição</u>	40
4.3.	Comparação de H3 com AQ1	41
4.4	Desenvolvimento da sensibilização locomotora	43
4.4.1	<u>Comparação do primeiro intervalo</u>	43
4.4.2	<u>Comparação do segundo intervalo</u>	44
4.4.3	<u>Comparação do terceiro intervalo</u>	45
4.4.4	<u>Comparação do quarto intervalo</u>	46
4.5	Teste de sensibilização	47
4.5.1	<u>Primeiro e segundo intervalos</u>	48
4.5.2	<u>Terceiro e quarto intervalos</u>	48
5.	DISCUSSÃO	51
5.1	Fenciclidina (PCP)	52
5.2	Racloprida (RAC)	52
5.3	Nicotina (NIC)	54
	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO - Artigo de referência	71

INTRODUÇÃO

A esquizofrenia (SCHZ) é uma doença que tem seu início no fim da adolescência e no começo da idade adulta. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) atinge cerca de 1% da população mundial (Yilmaz et al., 2021). Da mesma forma, o hábito de fumar, para 80% dos usuários, se inicia antes dos 18 anos, durante a adolescência. (Chen et al., 1998; Pierce et al., 1996). Quando olhamos a população de fumantes no Brasil, 20% iniciou o hábito antes dos 15 anos. Por conta desse alto índice de início precoce, o tabagismo é considerado uma doença pediátrica (Fiore, 2008; INCA, 2021a). Tanto a SCHZ quanto a dependência à Nicotina (e outras drogas de abuso) possuem circuitos córtico-estriatais frontais comuns envolvidos na gênese de ambas as doenças (Chambers e Robert, 2009).

Doenças psiquiátricas, como depressão e bipolaridade, são associadas com maior porcentagem de fumantes (Hartz et al., 2014; Luger et al., 2014), na SCHZ essa prevalência é ainda mais elevada. Nos Estados Unidos, cerca de 70% a 80% dos pacientes esquizofrênicos fazem uso de tabaco, enquanto que, para outras doenças psiquiátricas, a estatística está em torno de 50%. Esses dados se repetem ao redor do mundo (Herrán et al., 2000). Quando começamos a associar essas duas doenças, estudos anteriores mostram que o uso do tabaco em pacientes com SCHZ é de 50-90% (Kumari e Postma, 2005; Ohi et al., 2019). Comparando esses dados com a população geral, notamos que a prevalência de fumantes em pacientes com SCHZ é pelo menos duas vezes maior (de Leon e Diaz, 2005; Hartz et al., 2014; Ohi et al., 2019). Além desse alto índice, pessoas com SCHZ têm maior tendência a serem fumantes pesados, começam a fumar em idade mais precoce, geralmente consomem maiores quantidades de cigarros do que a população em geral (Ohi et al., 2019).

Apesar de haver uma maior consciência em relação aos malefícios do cigarro de tabaco, e o índice de consumo vir decrescendo na população como um todo, não observamos esse padrão entre os pacientes com transtorno esquizofrênico (Calheiros et al., 2006), o que, juntamente ao padrão diferenciado de consumo, faz com que essa população sofra intensamente as consequências maléficas do tabagismo à saúde (Mc Cloughen, 2003). Sendo um importante fator de risco evitável para doenças respiratórias, síndrome metabólica e doença cardiovascular (Ohi et al., 2019), Baxter (1996) afirma que as mortes por distúrbios respiratórios são 60% mais prováveis entre pessoas com doença mental em comparação com a população em geral, e as mortes por doenças cardíacas são 30% mais prováveis. Especificamente, a SCHZ está associada a um alto risco de mortalidade natural (Brown et al., 1999).

O consumo de tabaco em pacientes com SCHZ ganha força pela crença do efeito de automedicação da Nicotina nos sintomas, amplamente divulgada pelas indústrias de tabaco (Mccloughen, 2003; Hall e Prochaska, 2009; Green, 2010; Johnson et al., 2010), e pode ser reflexo de processo de institucionalização, tédio e baixo controle dos impulsos dos portadores dessa doença (Herrán et al., 2000; Goff et al., 1992; Hughes, 1986). Pacientes com SCHZ relatam que fumar produz relaxamento, reduz a ansiedade e os efeitos colaterais de medicações antipsicóticas, além de aliviar sintomas negativos tais como apatia, tédio e os sintomas da síndrome de abstinência (Glassman, 1993; Glynn e Sussman, 1990; Goff et al., 1992; Gilbert et al., 1997). Acredita-se que os produtos decorrentes da combustão do tabaco induzem as enzimas hepáticas a aumentarem o metabolismo dos antipsicóticos, assim, pacientes com SCHZ e fumantes apresentam menores níveis plasmáticos de neurolépticos (Marques de Oliveira, 2012).

Além das questões fisiológicas, os pacientes psiquiátricos são menos preocupados com convenções sociais e com as consequências em longo prazo do tabagismo à saúde (Gilbert e Gilbert, 1995). O consumo de tabaco encontra suas raízes na cultura dos hospitais psiquiátricos, a partir da falta de conhecimento e despreparo dos profissionais para lidar com esse fenômeno (Marques de Oliveira, 2012). Ainda como fator, temos a marginalização desses grupos, a típica alienação social e baixo nível socio econômico (Gilbert e Gilbert, 1995).

Por conclusão do que foi dissertado acima e da extensa literatura acerca do tema, o tabagismo apresenta uma forte presença na vida de pacientes psiquiátricos, principalmente com SCHZ que se inicia na adolescência (Lawn et al., 2002; Charry Alarcón, 2022), sendo associado a altos índices de mortalidade nessa população, devido ao aumento de vulnerabilidade às doenças crônicas, discinesia tardia e suicídio (Dalack et al., 1998; Malbergier e Oliveira Jr, 2005; Ratto et al., 2007; Diehl et al., 2009; Hausswolff-Huhlin et al., 2009; Lima Ramos et al., 2021). Portanto, os estudos acerca do assunto se tornam de suma importância, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dessa população.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Esquizofrenia

Em 1896, o psiquiatra alemão Emil Kraepelin identificou os primeiros sintomas do que ele chamou de demência precoce e em 1908 a doença passou a ser chamada de SCHZ (Resende, 2009). Hoje, sabemos que a SCHZ é uma doença crônica (Tajima-Pozo et al., 2015), que envolve a combinação de fatores predispostos (constitucionais, genéticos e bioquímicos) e ambientais (Aberg et al., 2013; Ripke et al., 2014). Possui alta taxa de mortalidade (Neto, Rodrigues e Elkis, 2007; Lima Ramos et al., 2021), e é considerada um transtorno psiquiátrico grave com comprometimento da percepção, pensamento, emoção e comportamento, o que afeta a vida social e profissional desses pacientes (Foussias et al., 2011). Fatores estressores durante o desenvolvimento como, por exemplo, infecções e experiências traumatizantes, podem se revelar como moduladores neuropatológicos primários em sujeitos geneticamente predispostos (Clarke et al., 2009), com alterações principalmente em genes associados que influenciam os processos de diferenciação e migração neuronal (Kamiya et al., 2005). Estudos volumétricos mostraram consistentemente volumes reduzidos de substância branca (além de mudanças claras na substância cinzenta) em pacientes, juntamente com trajetórias de desenvolvimento desviantes durante a adolescência e envelhecimento (por exemplo (Gogtay et al., 2012; Hulshoff Pol et al., 2004; Kuperberg et al., 2003; van Haren et al., 2012)).

A SCHZ é constituída pela combinação de 3 tipos de sintomas: positivos (hiperatividade, delírios, alucinações – auditivas, visuais e táteis), negativos (isolamento social, embotamento afetivo) e cognitivos (afetam a linguagem, a memória de trabalho e episódica, a velocidade de processamento, a resiliência ao estresse, o comportamento social, a inibição da atenção e o processamento sensorial) (Kennedy e Adolphs, 2012; Dias, 2020). Os primeiros sintomas da SCHZ se manifestam geralmente antes dos 25 anos, persistindo por toda a vida (Van Os e Kapur, 2009). Pode ser dividida em quatro fases, sendo que a fase pré-morbida ocorre baixa sociabilidade, com predileção por atividades solitárias ou ansiedade social, e alterações cognitivas (principalmente déficits de memória verbal, atenção e funções executivas), identificadas em filhos de indivíduos portadores de SCHZ, podem ser consideradas alterações pré-mórbidas. A fase prodrômica é caracterizada por um período que antecede a eclosão da psicose, em que o indivíduo pode apresentar um estado de apreensão e perplexidade sem um foco aparente. A fase de progressão culmina muitas vezes com o primeiro episódio de psicose.

Por fim, a SCHZ evolui para fase estável, sujeita a recaídas e surgimento dos sintomas positivos (Pitta, 2019).

Dentre os transtornos mentais, a SCHZ é considerada a mais incapacitante (Dias, 2020). Porém, apesar de ter se passados mais de um século de conhecimento, as causas permanecem obscuras devido à complexidade da doença e a dificuldade de se obter um diagnóstico precoce. É uma doença que não apresenta cura, e o tratamento se resume a alívio dos sintomas (Resende, 2009). O principal tratamento são os antipsicóticos típicos e atípicos que atuam principalmente nos sintomas positivos (Nuechterlein et al., 2004; Keefe et al., 2007; Horan, 2007). Dessa maneira, existem diferentes hipóteses que tentam explicar o surgimento da doença e uma série de estudos acerca do tema. Algumas hipóteses são propostas para explicar a gênese desse transtorno mental, sendo mais consistentes as hipóteses: dopaminérgica (aumento de dopamina mesolímbica e diminuição de dopamina mesocortical) e glutamatérgica (Diminuição do sistema glutamatérgico). Além dessas duas hipóteses, a teoria serotoninérgica e a teoria do ácido gama-aminobutírico (GABA) estão significativamente correlacionadas com a patogênese da SCHZ (Wang, 2021).

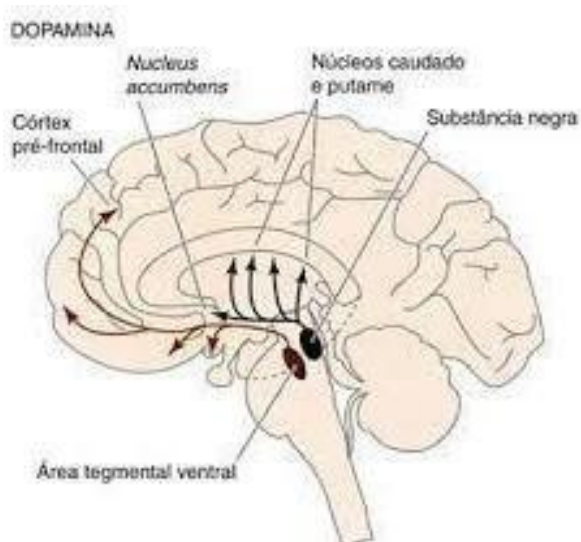
1.2. Hipótese dopaminérgica e glutamatérgica

Os neurônios dopaminérgicos desempenham um papel crucial no controle de múltiplas funções cerebrais, incluindo movimentos voluntários e no sistema de recompensa que controla o aprendizado de muitos comportamentos específicos, como humor, recompensa, dependência e estresse (Shankar et al., 2005). De acordo com Robinson e Berridge (1993; 2001), além de mediar a sensação subjetiva de prazer, a dopamina regularia o impulso motivacional e a atenção a estímulos salientes, incluindo os estímulos reforçadores.

O sistema dopaminérgico mesencefálico foi dividido em dois sistemas principais (figura 1). O sistema nigroestriatal, que se origina na zona compacta da substância negra e estende suas fibras até o caudado-putâmen (também conhecido como estriado dorsal), envolvido no controle motor voluntário e no processamento da informação pelos gânglios da base (Hedreen e DeLong, 1991). E também o sistema mesocorticolímbico que surge de células dopaminérgicas presentes na área tegmental ventral (ATV), envolvido no comportamento baseado na emoção, incluindo motivação e recompensa, que se dá pela sobreposição entre os neurônios dopaminérgicos mesocorticais e mesolímbicos (Ikemoto e Wise, 2004). Os neurônios do sistema mesocortical projetam-se para o córtex pré-frontal (CPF), cíngulo e perirrinal, enquanto que os neurônios

do sistema mesolímbico projetam-se no núcleo acumbente (NAcc), tubérculo olfativo, septo, amígdala e hipocampo (HP) (Le Moal e Simon, 1991).

Figura 1 - Vias dopaminérgicas afetadas na SCHZ.



Legenda: Os neurônios da substância negra se projetam para o caudado-putâmen (sistema nigroestriatal) e os neurônios da ATV se projetam para o CPF, cíngulo e perirrinal (sistema mesocortical), e para o NAcc, tubérculo olfativo, septo, amígdala e HP (sistema mesolímbico).

Fonte: Barrett et al., 2014.

A hipótese dopaminérgica para explicar a SCHZ, propõe que a dopamina é uma final comum para a passagem de vários fatores ambientais e genéticos predisponentes. (Lau et al., 2013). Essa hipótese é sustentada pelo fato de os antipsicóticos terem uma ação de bloqueio nos receptores pós-sinápticos da dopamina do subtipo D2 (Stahl, 2018). Evidências favoráveis a essa hipótese incluem dados que mostram associação entre sintomas positivos da SCHZ e um aumento anormal da atividade do sistema dopaminérgico na via mesocorticolímbica. Estudos usando métodos de tomografia por emissão de pósitrons (PET) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) mostraram uma elevação da taxa de síntese dopaminérgica pré-sináptica estriatal em pacientes com SCHZ (Nikolaus et al., 2009; Howes et al., 2009). Já os sintomas negativos estão associados a hipoatividade nas projeções dopaminérgicas corticais (Davis et al., 1991; Abi-Dargham e Moore, 2003), essa conclusão surgiu pois o uso de neurolépticos são apenas parcialmente eficazes no alívio dos sintomas negativos sugerindo que estes sintomas podem não estar relacionados à atividade excessiva da dopamina (Andreasen et al., 1982). Além disso, evidências obtidas em humanos sugerem que o polimorfismo no gene

que codifica a catecol-O-metiltransferase, uma enzima envolvida na degradação da dopamina, está associado à hipoatividade dos neurônios dopaminérgicos pré-frontais na SCHZ (Slifstein et al., 2008). Há dados que indicam que a possível co-ocorrência de alta e baixa atividade de dopamina na SCHZ estão relacionadas, e explicaria a presença concomitante de sintomas negativos e positivos (Kenneth et al., 1991).

Mesmo que a hipótese da dopamina continue sendo a principal da SCHZ, novas evidências de pesquisas de outros sistemas de neurotransmissores, incluindo glutamatérgico, serotoninérgico, GABAérgico e adenosinérgico (Farber, 2003; Coyle e Tsai, 2004), fornecem uma perspectiva multifatorial de SCHZ.

O bloqueio do receptor NMDA gera sintomas semelhante aos observados na manifestação clínica da SCHZ, e os efeitos de antagonistas dos receptores NMDA como a Fenciclidina (PCP) e o anestésico dissociativo, cetamina, evidenciam o envolvimento desse sistema na fisiopatologia da doença, pois ambos causam alterações psiquiátricas e fisiológicas que se assemelham mais à SCHZ do que os sintomas induzidos pela anfetamina/agonistas dopaminérgicos (Kudoh et al., 2000). Assim, a partir de estudos do uso da Fenciclidina como droga recreativa, surgiu a hipótese glutamatérgica, devido aos seus efeitos alucinógenos.

Há evidências apontando para alterações na atividade dopaminérgica subcortical como um dos circuitos responsáveis por promover alterações na neurotransmissão glutamatérgica na substância negra (Mueller et al., 2004). Um estudo PET revelou um aumento na concentração de dopamina estriatal com o uso do antagonista de N-Metil-D-aspartato (NMDA) S-cetamina, apoiando a noção de que o receptor glutamatérgico NMDA pode contribuir para sintomas psicóticos através da modulação da via dopaminérgica (Vollenweider et al., 2000). Foi levantada a hipótese de que o antagonismo dos receptores dopaminérgicos D2 pode impedir a potenciação mediada por receptores dopaminérgicos D1 das respostas de NMDA no CPF (Paz et al., 2008). Portanto, a hipofunção glutamatérgica tem sido sugerida como um dos mecanismos envolvidos nesta disfunção dopaminérgica na SCHZ (Lang et al., 2007).

O glutamato funciona como o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos e seus níveis são fortemente regulados. Esses processos regulatórios são de altos níveis de consumo de glicose e oxigênio e exercem um controle rígido na neurotransmissão glutamatérgica (Niciu et al., 2012), e existem para manter e facilitar uma variedade de funções vitais do cérebro, como cognição, memória, neurodesenvolvimento e plasticidade sináptica (Bliss e Collingridge, 1993). Estudos post-mortem de cérebros de pacientes com SCHZ demonstraram diminuição na densidade de receptores glutamatérgicos no

CPF, tálamo e lobo temporal (Meador-Woodruff, 2000). Também foi encontrada diminuição na concentração de glutamato no líquido cefalorraquidiano, corroborando com evidências da hipofunção glutamatérgica (Celotto et al., 2019). A hipoatividade do receptor NMDA prejudica o neurodesenvolvimento, exercendo um efeito neurotóxico (de Rezende, 2013) tornando o sistema nervoso vulnerável (Girirajan e Eichler, 2010). Em conclusão, a hipótese dopaminérgica explica a SCHZ ao propor a dopamina como a via final comum. Contudo, entendemos que outros sistemas de neurotransmissores interagem com o sistema dopaminérgico, tendo papel relevante no quadro da SCHZ (Chi-Ieong Lau, et al., 2013).

1.3. Modelo de schz

Antagonistas do receptor NMDA tais como a Fenciclidina causam um quadro clínico semelhante à SCHZ, incluindo sintomas positivos, negativos e desagregação do pensamento (de Rezende, 2013). A Fenciclidina foi desenvolvida em 1926 e patenteada pela primeira vez em 1952 pela empresa farmacêutica Parke-Davis e comercializada sob a marca Sernyl (Luby et al., 1959). Em acordo com a hipótese glutamatérgica, um dos modelos animais de SCHZ mais utilizados se baseia na administração subcrônica de antagonistas NMDA como a cetamina e a Fenciclidina, que podem induzir sintomas semelhantes à SCHZ em camundongos experimentais, gerando comportamentos associados a sintomas positivos, negativos e cognitivos, como hiperlocomoção, aprendizado e memória prejudicados, depressão, ansiedade, comportamento social prejudicado e outros sintomas (Wang X, 2021). Os efeitos da Fenciclidina subcrônica são consistentes com achados em humanos que mostram que o abuso repetido de Fenciclidina induz sintomas esquizofreniformes e hiperresponsividade do sistema dopaminérgico mesolímbico (Jentsch e Roth, 1999). Uma principal barreira ao desenvolvimento de modelos animais com alta validade de representação é que os sintomas primários da SCHZ, como alucinações, delírios, anormalidades de fala e comportamento inapropriado, são impossíveis de serem modelados em outras espécies. Entretanto, diversos paradigmas comportamentais têm sido desenvolvidos e possuem alguma relevância na SCHZ, incluindo hiperlocomoção, déficit de interação social, efeitos na inibição pré-pulso (PPI). A associação de hiperlocomoção com sintomas positivos da SCHZ está baseada no seu início pós-adolescência e na exacerbação com antagonistas de receptor de NMDA, indicando excesso de dopamina subcortical (Goff e Coyle, 2001). Déficits de interação social estão associados aos sintomas negativos (Rapoport et al., 2005), memória de trabalho e aprendizado visual estão associados aos sintomas cognitivos (Swerdlow et al., 1994).

1.4. Nicotina

Estudos anteriores mostram que 1,4 bilhões da população geral faz uso de tabaco (Reitsma et al., 2021). No Brasil, entre o período de 1989 a 2019 houve uma queda de 34,8% de fumantes para 12,6% relatados pela Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) (INCA 2020). Segundo a WHO (2019), aproximadamente 24,9% da população mundial com 15 anos ou mais era fumante em 2015 e há uma expectativa que esse número diminua para 20,9% em 2025. Estes dados indicam uma tendência de queda no consumo do tabaco, possivelmente advinda de medidas implementadas, como proibição de fumar em ambientes fechados, adoção de advertências sanitárias em embalagens de cigarros, aumento de preços e impostos, proibição de propaganda, promoção e patrocínio, oferta de tratamento para deixar de fumar em unidades do Sistema Único de Saúde e campanhas educativas (INCA, 2020). Apesar desse declínio, o tabagismo ainda chama muita atenção dos governos e pesquisadores. Atualmente o uso do tabaco é considerado um problema de saúde pública, pois é a principal causa de morte evitável no mundo. Além de ser um problema crônico (Marques de Oliveira, 2012). Mais de um bilhão de pessoas fumam no mundo todo, das quais aproximadamente 1/4 são adultos e a WHO aponta que o tabaco mata mais de 8 milhões de pessoas por ano, sendo que mais de 7 milhões dessas mortes resultam do uso direto desse produto, enquanto cerca de 1,2 milhão é o resultado de não-fumantes expostos ao fumo passivo (WHO, 2021). No Brasil, 443 pessoas morrem a cada dia e são gastos R\$125.148 bilhões com os custos dos danos produzidos pelo cigarro no sistema de saúde e na economia (IECS, 2020).

Para aqueles que desenvolvem a dependência, o tabagismo pode causar prejuízos a saúde física e mental e também a vida social e a econômica (Marques de Oliveira, 2012). E, em razão do uso de substância psicoativa, o tabagismo integra o grupo de transtornos mentais e comportamentais, de acordo com a Revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde [CID-10] (WHO, 2022). Estudos pré-clínicos recentes demonstraram que a exposição à Nicotina em adolescentes produz efeitos que duram até a fase adulta como, declínios na transmissão colinérgica e sua modulação de transmissores de monoaminas como a serotonina (Abreu-Villaca et al. 2017).

O cigarro é composto por várias substâncias químicas, como o tiocianato, o monóxido de carbono e outros gases tóxicos (Stellman e Djordjiciv, 2009), mas a principal substância é a Nicotina. A Nicotina é absorvida pelo trato respiratório, mucosas orais e pele e é capaz de

atravessar a barreira hematoencefálica em 10 a 20 segundos após a absorção (Benowitz et al., 1998), propagando-se por todas as áreas do SNC, desde as regiões mais internas até o córtex (Rosemberg, 1999). Cerca de 80 a 90% é metabolizada pelo fígado, enquanto que o restante pode ser metabolizado em outros órgãos como o pulmão e os rins (Hukkanen e Jacob, 2005).

As ações da Nicotina no sistema de recompensa são múltiplas, se ligando nos receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs) (Franken et al., 1980), promovendo a liberação de neurotransmissores como norepinefrina, acetilcolina, serotonina, GABA, glutamato e endorfinas (Gupta, 2007). Durante a adolescência a expressão de nAChRs é elevada o que pode potencializar os efeitos da Nicotina (Abreu-Villaca et al. 2017; Doura et al., 2008). A curto prazo, essa exposição pode levar a um aumento da atividade dopaminérgica aumentando a liberação de dopamina no NAcc. (Brodie, 1991; Dong et al., 2010; De Biasi e Dani, 2011). Os neurônios dopaminérgicos da ATV que se projetam para o NAcc são ativados diretamente pela ligação da Nicotina aos nAChRs pós-sinápticos, bem como indiretamente pela sua ligação aos nAChRs pré-sinápticos localizados nos terminais dos neurônios glutamatérgicos que, por sua vez, modulam a atividade desses neurônios dopaminérgicos (Abreu -Villaca et al., 2017; Wills et al., 2022).

1.5. Tabagismo e esquizofrenia

Os primeiros sintomas da SCHZ se manifestam geralmente antes dos 18 anos (Kumra, et al., 2008) e 6% antes 16 anos (Merry e Werry; 2001), idade em que também se percebe a introdução do cigarro e outras drogas, e por isto a relação entre o tabagismo e a SCHZ começa a ser investigada (Van e Kapur, 2009). É de conhecimento dos estudiosos que a adição a Nicotina e a SCHZ apresentam uma circuitaria neural em comum (Chambers, 2001; Nestler et al., 2005; Gargiulo e De Gargiulo, 2014). A Nicotina exerce seus efeitos reforçadores e procognitivos, importantes determinantes da dependência do tabaco na SCHZ, modulando a liberação de dopamina no sistema mesocorticolímbico e HP através de uma interação intrincada com mecanismos GABA - e Glutamatérgicos (Wing et al., 2012). Esses efeitos alteram o funcionamento dos sistemas, o que pode influenciar no quadro psicopatológico e na responsividade do paciente com SCHZ ao tratamento (Herrán et al., 2000).

Dados mostram que a prevalência de tabagismo em pacientes que apresentaram seu primeiro episódio de psicose é de 57% (Gurillo et al., 2015). O cigarro possui efeitos psicoativos capazes de diminuir a ansiedade, a euforia, entre outras sensações, causando prazer aos usuários. Pacientes com alterações neurológicas, comumente manifestam ansiedade e/ou

depressão, dessa forma ocorre um reforço do uso de tabaco por pacientes com transtornos psiquiátricos (Calheiros et al., 2006). Contudo, há também estudos que mostram que o tabagismo pesado em indivíduos com SCHZ está associado a níveis mais altos de sintomas positivos e sintomas negativos (Dalack, 1998; Ziedonis, 1994).

1.6. Cérebro Adolescente

A WHO define adolescentes como indivíduos na faixa etária de 10 a 19 anos e “juventude” como a faixa etária de 15 a 24 anos (WHO, 1989). A adolescência é marcada por uma série de características comportamentais, neuroquímicas, hormonais, metabólicas e estruturais, fazendo com que sejam mais frequentemente propensos a comportamentos de risco. Possuem também como característica, o impulso de serem socialmente aceitos e buscar auto-identidade, o que reforça comportamentos de riscos. Devido a essas características do cérebro adolescente, estes se tornam mais propícios ao uso de substâncias e desenvolvimento de dependência (Fahrizal et al., 2018). Segundo estudos, a idade do primeiro contato com as drogas parece ser de crítica importância para o desenvolvimento da dependência, apresentando maior probabilidade de desenvolver dependência quanto mais cedo for o primeiro contato (Rodgers et al., 1995; Taioli e Wynder, 1991; Breslau et al., 1993; Nides et al., 1995; Kandel et al., 2000). A prevalência do tabagismo em jovens no mundo é de 15 a 24 anos é cerca de 20,1% entre homens e 4,95% em mulheres, 82,6% dos fumantes começaram o vício em torno dessa faixa etária (Pereira et al., 2021). Isso ocorre porque, a ocorrência de mudanças drásticas no desenvolvimento cerebral durante a adolescência, poderiam predispor um indivíduo a experimentar substâncias como drogas ilícitas, álcool e tabaco (Spear, 2000). Nesse período ocorre o desenvolvimento do encéfalo, com apoptose e rearranjo sináptico em diversas regiões (Bayer et al., 1982), seguido por um extenso período de eliminação e refinamento sináptico (Bianchi et al., 2013) estando associado à expressão de comportamentos tipicamente adolescente (Spear et al., 2013). Regiões neurais que sofrem alterações durante esta fase, como o CPF e outras regiões de projeções dopaminérgicas do prosencéfalo atuam fortemente na modulação de mecanismos de recompensa associados ao uso de drogas (Koob, 1992) portanto, não é surpresa constatar que adolescentes respondem de formas diferentes às drogas de abuso quando comparados com adultos (Spear, 2002).

Em roedores, a adolescência compreende o período que vai do 28º ao 60º dia de vida pós-natal (Spear, 2000). Roedores também apresentam traços comportamentais característicos da adolescência, tais como: elevados níveis de busca pela novidade (Adriani et al., 1998),

impulsividade (Adriani e Laviola, 2003) e comportamento de risco (Adriani et al., 2002), assim como redução de resposta ao estresse (Adriani e Laviola, 2000).

1.7. Automedicação x vulnerabilidade compartilhada

Quando se observa a via dopaminérgica em pacientes com SCHZ e tabagistas, nota-se impactantes alterações. No tabagismo podemos observar aumento da atividade dopaminérgica, alterações essas que servem de base para a adição às drogas (Mccloughen, 2003; Glassman, 1993). Já no transtorno esquizofrênico observamos dois tipos de alterações. No CPF ocorre um prejuízo na neurotransmissão dopaminérgica causando os sintomas negativos e cognitivos (Goff et al., 1992; Gilman e Newman, 1996), já na via mesolímbica do cérebro esquizofrênico encontramos uma hiperatividade do sistema dopaminérgico relacionada aos sintomas positivos (Andreasen, 1982). O fato de ocorrer essa similaridade de alterações nos circuitos cerebrais, somados ao alto percentual de pacientes com SCHZ fumantes, indica uma relação forte entre tabagismo e SCHZ. Quando se analisa essa relação, alguns estudos apresentam dados que demonstram que o tabagismo tem início antes do surgimento dos sintomas psicóticos (Ma, Li, Meng, et al., 2010; Zhang, et al., 2010; Riala et al., 2005). Outros estudos, em oposição, defendem que ocorre após início dos surtos psicóticos (Beratis et al., 2001). Diferenças metodológicas podem explicar estes resultados opostos, contudo, a comorbidade é consenso entre os pesquisadores, sendo os mecanismos subjacentes ainda pouco estudados. Nesse sentido, existem duas teorias principais que tentam explicar o alto percentual de pacientes com SCHZ que são fumantes. A teoria da automedicação e da vulnerabilidade compartilhada.

Há estudos que defendem o uso do tabaco como uma forma de automedicação, gerando um efeito protetor contra o desenvolvimento do transtorno, assim como alívio dos sintomas negativos (Marques de Oliveira, R., 2012) e reduzindo dificuldades como estresse, redução da atenção, cognição e processamento de informações (Glassman et al., 1993). O desejo dos pacientes de diminuir os sintomas ou diminuir os efeitos colaterais do tratamento antipsicótico era perceptível (Khantzian, 1997). Assim, se iniciou a hipótese da automedicação que se baseia na crença de que a Nicotina seria capaz de aliviar sintomas da SCHZ (Glassman, 1993). Além disso, a Nicotina seria capaz de estimular o estado de alerta e a liberação de endorfinas, causando sensação de prazer (Pomerleau e Pomerleau, 1990). Também é relatado o uso do cigarro para reduzir efeitos adversos dos antipsicóticos, já que a Nicotina acelera seu metabolismo, diminuindo o nível de alguns antipsicóticos no sangue (Goff et al., 1992; Ereshefsky et al., 1991).

Uma teoria alternativa, de base biológica, às vezes chamada de “hipótese de dependência primária” (Chambers et al., 2001) ou uma “síndrome de deficiência de recompensa” (Green et al., 1999), é a hipótese da vulnerabilidade compartilhada, que propõe que fatores genéticos comuns e anormalidades nas vias de recompensa tornam os pacientes com SCHZ suscetíveis ao tabaco (George, 2007). É possível também que as propriedades da Nicotina em acentuar a liberação de dopamina sirvam como um intensificador às disfunções nesse sistema apresentadas em pacientes psiquiátricos (Glassman, 1993).

Como evidencia da teoria da vulnerabilidade compartilhada, uma significativa parcela de pacientes apresentam mudanças no comportamento impulsivo e tendência suicida, e o tabagismo está associado a essa parcela (Iancu et al., 2006). Um estudo concluiu que, os fumantes com SCHZ taiwaneses, comparados aos não fumantes, tinham mais ansiedade, depressão, impulsividade e risco de suicídio (Kao et al., 2011).

1.8. Sensibilização

O uso de drogas de abuso psicoestimulantes com o tempo se torna progressivamente mais atrativo e capaz de controlar o comportamento. Os usuários então passam a apresentar comportamentais de desejo intenso pela droga (“fissura”). Essa particularidade leva ao uso repetido e compulsivo da droga induzindo uma resposta aumentada, progressiva e persistente (Segal e Mandell, 1974; Babbini e Davis, 1972; Clarke e Kumar, 1983). Esse processo é denominado sensibilização (Robinson e Becker, 1986; Kalivas e Stewart, 1991; Gaulden et al., 2021). Foi relatado que, em roedores, essa resposta aumentada a droga pode ser evocada até um ano após a interrupção da exposição (Paulson et al., 1991). A sensibilização comportamental mais frequentemente estudada em animais experimentais é a sensibilização locomotora e esta é acompanhada por aumento nos receptores de dopamina pós-sinápticos, aumento na síntese de dopamina, aumento na utilização e/ou liberação de dopamina e diminuição dos autorreceptores de dopamina (Robinson e Becker, 1986). Porém a dopamina não é o único neurotransmissor atuante na sensibilização. Além das projeções dopaminérgicas do ATV para o NAcc, existem projeções glutamatérgica do CPF medial para o NAcc (Pierce e Kalivas, 1997). O desenvolvimento da sensibilização comportamental pode ser dividido em duas fases: aquisição (AQ) e expressão. A AQ são as alterações imediatas causadas pela droga, comumente ligadas à sensibilização neuroquímica do sistema dopaminérgico na ATV, e a expressão são as consequências a longo prazo desses eventos iniciais associadas ao NAcc (Robinson e Becker, 1986; Kalivas e Stewart, 1991; Steketee et al., 2011).

Em modelo animal, a sensibilização leva ao aumento da resposta motora e comportamentos estereotipados, que podem ser observados com monitoramento da atividade motora durante o teste do campo aberto (CA) (Jun Gao et al., 2015). A atividade hiperlocomotora somada ao aumento progressivo dessa atividade, caracteriza a sensibilização locomotora, e é um modelo bem conhecido de plasticidade comportamental associada aos sintomas positivos de SCHZ (Richtand et al., 2001). Esse modelo de sensibilização induzido pela administração de drogas já está estabelecido no campo de pesquisa de abuso de substâncias (Paulson et al., 1991) e já foi observado em resposta à cocaína, anfetamina, morfina, etanol, Nicotina e 9-tetrahidrocanabinol (Joyce e Iversen, 1979; Robinson e Becker, 1986; Benwell e Balfour, 1992; Cunningham e Noble, 1992; Post et al., 1992; Cadoni et al., 2001). A sensibilização locomotora é resultado de adaptações duradouras neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesolímbico (Robinson e Becker, 1986; Nestler et al., 2001). Evidências sugerem existir bases moleculares e neurais compartilhadas entre a sensibilização locomotora e os processos SCHZ e de dependência (Cador et al., 1995; Vezina, 2004). Por essa razão, o teste de sensibilização comportamental em modelo animal é uma forma muito usada de se estudar alterações comportamentais e fisiológicas em um modelo de SCHZ.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Contribuir para o entendimento das bases biológicas da associação entre esquizofrenia e tabagismo. Para isso, iremos fazer uma pré-exposição a Nicotina em camundongos no período da adolescência utilizando uma minibomba osmótica com liberação de Nicotina até o final do teste de aquisição. E em seguida avaliar a resposta ao modelo de esquizofrenia por antagonismo de receptor NMDA.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar se a preexistência de um modelo de exposição à Nicotina altera a susceptibilidade dos animais ao modelo de esquizofrenia através da indução da Sensibilização locomotora no teste de CA;

Investigar o papel do sistema dopaminérgico na sensibilização comportamental, através da administração de antagonista dopaminérgico D2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Este trabalho de natureza experimental foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Neste projeto foram usados camundongos C57BL/6 provenientes de colônias mantidas na Universidade Federal Fluminense (Niterói, Brasil) por mais de 60 gerações. Usamos ninhadas geradas a partir dos cruzamentos entre estes animais (1 a 2 fêmeas para cada macho) e mantivemos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia do DCF/IBRAG com temperatura controlada em torno de 21-22°C, ciclo de luminosidade de 12 horas (com luzes se apagando as 14 horas) e com livre acesso à comida e água. Após o desmame, apenas as ninhadas que tiveram entre 4 e 9 filhotes foram selecionadas e separadas em caixas com 2-5 camundongos para o projeto. O desmame e a separação por sexo ocorreu no 25º dia pós-natal (PN 25) e os camundongos foram individualizados em PN 36 e alocados um macho e uma fêmea de forma aleatória entre os grupos. Tendo em vista os possíveis efeitos ansiogênicos do isolamento social, todas as gaiolas com animais individualizados contavam com enriquecimento ambiental: um duto plástico e uma folha de papel enrolada de forma compacta.

Os procedimentos de experimentação animal descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA-UERJ) sob o nº 033/2018 e estão de acordo com a declaração de Helsinque e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelo *National Institute of Health*.

3.2. Preparação das mini-bombas

As minibombas (MB) osmóticas subcutâneas (s.c.) (modelo 1002, Alzet Durect Corporation, Cupertino) foram preparadas em PN 36 e implantadas em PN 37, quando teve início a exposição previa à Nicotina que perdurou por 14 dias após o implante. Nesse momento os animais foram separados em dois grupos, o grupo controle (CONT); e o grupo Nicotina (NIC). O comportamento de ambulação e exploração desses dois grupos foram analisadas por 3 dias (dias de habituação) a fim de avaliar a ação da Nicotina sem interferências de outras drogas. As MB destinadas aos animais CONT, foram preenchidas com água estéril enquanto os animais NIC receberam MB preenchidas com Nicotina free base diluída em água estéril, de forma a liberar uma dose inicial de 24mg/Kg/dia de Nicotina, essa dose foi escolhida com base

em um estudo onde ratos foram expostos a mesma dose (Hambsch et al., 2014) que foi capaz de produzir níveis de Nicotina similar a faixa encontrada em fumantes (Massadeh et al., 2009; Wood et al., 2004). Essa solução sofreu ajuste de seu pH para $6,0 \pm 0,5$ com o uso de soluções de HCl 6M e NaOH 5M. As MBs foram pesadas antes e depois de serem preenchidas para garantir que foram totalmente preenchidas com o líquido. Em seguida, foram deixadas imersas em solução salina (NaCl 0,9%) e levadas a uma estufa à 37°C até a realização das cirurgias, no dia seguinte. Escolhemos esse método de exposição para garantir uma liberação constante e homogênea que irá durar do dia da implantação até o último dia de AQ (PN37 – PN50). Assim, o período de exposição tem início na adolescência pós-puberdade e se estende até durante a transição entre a adolescência e a idade adulta de roedores (Adriani et al., 2002).

3.3. **Cirurgia**

As cirurgias ocorreram em PN 37 durante o período de 8h às 14h. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina (100mg/kg, i.p) e xilasina (10mg/kg, i.p). Os animais tiveram o dorso raspado e higienizado com álcool etílico 70% e foi feita uma pequena incisão de 1 cm para a implantação da MB. Com uma tesoura de ponta arredondada, a pele foi separada do tecido subcutâneo, abrindo um espaço onde a MB foi implantada com o auxílio de uma pinça. A incisão foi então suturada com fio próprio (catgut simples 3.0). Os animais receberam 20µl de antibiótico (Enrofloxacino, 2,5mg/kg, s.c.) e anti-inflamatório (Flunixin, 2,5mg/kg, s.c), e foram devolvidos ao biotério, onde permaneceram até o início da avaliação comportamental.

3.4. **Ambiente experimental**

O período de teste se estendeu de PN 42 à PN 57. Cada sessão foi realizada sempre no período de 8h – 12h, durante a fase clara em uma sala com temperatura controlada à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e luz branca indireta. cada teste teve duração de 60 min, interrompidos pelo ciclo de injeções. Os animais eram retirados do biotério de 4 em 4 e alocados em uma antessala onde eram ambientados por 10 min antes do teste e recebiam o ciclo de injeções durante as interrupções. Na sala onde ocorreram os testes se encontrava quatro caixas de atividade automáticas de acrílico (46 x 46 x 46 cm) onde foi realizada a atividade de CA, que permitia testar quatro animais por vez. Entre cada teste, as caixas eram higienizadas com papel toalha humedecido com álcool 35% e secadas. As caixas emitem feixes infravermelhos que, quando interrompidos pelo animal, geram contagens automáticas que são enviadas a um computador e convertidas em

centímetros percorridos por um software (Monitor de Atividades – Insight, Ribeirão Preto, SP). Para a análise de cada sessão, a variável, distância percorrida, foi avaliada em 3 intervalos de 10 min (para avaliar o efeito imediato das drogas) e em um quarto intervalo com a média dos 30 min finais (para avaliar os efeitos tardios das drogas).

Todas as etapas foram filmadas por uma webcam posicionada à 100 cm acima das caixas de atividades. Em uma sala disposta ao lado da sala de teste era possível avaliar o funcionamento das caixas e observar o comportamento dos animais, através de computadores e em tempo real.

3.5. **Sensibilização locomotora**

No intuito de sensibilizarmos os camundongos à droga Fenciclidina, utilizamos um protocolo de sensibilização com 4 etapas já estabelecido e adaptado de Volf e colaboradores (2012).

A 1ª etapa foi a HABITUAÇÃO (H), que ocorreu de PN 42 à PN 44. Após a aclimação na antessala, cada camundongo foi colocado no centro da caixa para início do teste de CA, e deixado para explorá-la livremente por 10 minutos. Nesse momento ocorreu a primeira interrupção, quando os camundongos receberam a primeira injeção (s.c.) de salina e retornaram imediatamente após, para a arena por mais 10 minutos. Em seguida, receberam a segunda dose de injeção (s.c.) de salina e foram deixados na arena por mais 40 minutos. Sendo assim, os animais foram habituados aos ciclos de injeções utilizados nas etapas subsequentes e ao ambiente de teste.

A 2ª etapa é a de AQUISIÇÃO. Durante os 6 dias seguintes à H, o teste foi feito repetindo o passo-a-passo descrito na etapa anterior, porém, na primeira injeção foi administrada salina na metade dos animais CONT e NIC; e Racloprida (0,25mg/kg, s.c.) na outra metade. Já na segunda injeção, foi administrada Fenciclidina (10mg/Kg, s.c.) em todos os animais. Assim, nesta etapa, foram gerados 4 grupos experimentais para cada sexo:

Tabela 1 – Grupos Experimentais

	GRUPO	TRATAMENTO
CON T	PCP (♀:14, ♂:12)	Mini-Bomba de H ₂ O, salina e Fenciclidina
	RAC-PCP (♀:12, ♂:12)	Mini-Bomba de H ₂ O, racloprida e Fenciclidina
NIC	NIC-PCP (♀:12, ♂:12)	Mini-Bomba de Nicotina freebase, salina e Fenciclidina
	NIC-RAC-PCP (♀:14, ♂:12)	Mini-Bomba de Nicotina freebase, racloprida e Fenciclidina

Legenda: CONT: animais que receberam mini-bombas preenchidas com água ésteril; NIC: animais que receberam mini-bombas preenchidas com Nicotina (24mg/Kg/dia); RAC: animais que receberam injeções de racloprida; PCP: animais que receberam injeções de Fenciclidina.

Fonte: A autora, 2022.

Vale salientar que os primeiros 10 minutos de testes, quando não foi administrada nenhuma droga além da Nicotina via MBs, foram usados no intuito de avaliar o comportamento basal dos animais.

Ao final da 2ª etapa, todos os grupos passaram por 5 dias de RETIRADA, 3ª etapa. Neste momento os animais não receberam nenhum tratamento e nem foram manipulados. De acordo com o que se encontra descrito nas especificações das MBs, durante esse período de retirada, não ocorreria mais liberação de Nicotina. Sendo assim, os animais não estavam sendo expostos a nenhuma substância durante a etapa de RETIRADA e DESAFIO.

A etapa do DESAFIO (D), que tem o intuito de observar a expressão da sensibilização, ocorreu de forma similar ao descrito no período de indução. Em PN 56, após a exploração do CA por 10 min, todos os animais receberam salina na primeira injeção. Logo, nos dois primeiros intervalos poderíamos verificar o efeito ao logo prazo das drogas anteriores. Já na segunda injeção, metade dos animais de cada grupo recebeu um desafio de Fenciclidina (10mg/kg, s.c.) enquanto que a outra metade recebeu um desafio de Nicotina (0,5mg/kg, s.c.). Dessa forma, com os dois últimos intervalos, podemos verificar a possível expressão de uma sensibilização cruzada e se a exposições as diferentes drogas anteriores, interferiram nesse desfecho.

3.6. Linha do tempo

Na figura 2 é apresentada a linha do tempo do projeto. Para que possamos identificar, de forma visual, o passo-a-passo e quando ocorreu cada etapa do projeto.

Figura 2 – Linha do Tempo do Projeto



Legenda: Linha do tempo do projeto especificando cada acontecimento e o período PN específico que ocorreu. Período de habituação (H1-H3), período de aquisição (AQ1-AQ6) e desafio (D)

Fonte: A autora, 2022.

3.7. Análise estatística

Para evitar erros estatísticos do tipo 1 que podem resultar de testes repetidos, os dados de cada fase do experimento (H, AQ e D) foram avaliados por análises de variância de medidas repetidas (rANOVAs). Foram utilizados os fatores Nicotina (expostos: grupos NIC-PCP e NIC-RAC-PCP; não expostos: grupos PCP e RAC-PCP), Racloprida (tratados: grupos RAC-PCP e NIC-RAC-PCP; não tratados: PCP e NIC PCP) e Sexo. O fator Desafio (Nicotina e Fenciclidina) foi usado para a análise do último dia de teste. Dia e Intervalo foram os fatores de repetição. rANOVAs de menor ordem em cada dia e/ou intervalo, ANOVAs univariadas (uANOVAs), testes Fisher Protected Least Significant Difference (FPLSD) e testes t pareados foram usados post hoc quando apropriado.

Avaliamos a atividade locomotora de cada grupo ao longo dos dias de teste no intuito de caracterizar o desenvolvimento da sensibilização comportamental (aumento progressivo da atividade durante a AQ) pela comparação entre os dias da fase de AQ1 a AQ6. Como todos os grupos receberam Fenciclidina durante a AQ, para avaliar que esta droga causou aumento da atividade já em AQ1, comparamos as atividades entre H3 e AQ1. Quanto a expressão da sensibilização comportamental, analisada após o período de retirada, foi verificado se houve aumento da atividade locomotora entre AQ1 e o dia do D.

Todos os dados foram analisados usando o IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 21.0 (IBM Corp, Armonk, N.Y., U.S.A.) e compilados como médias e erros padrão. A significância foi assumida ao nível de $p < 0,05$ para efeitos principais; no entanto, para

interações em $p < 0,1$, também examinamos se os efeitos principais de menor ordem eram detectáveis após a subdivisão das variáveis interativas (Snedecor e Cochran, 1967). O critério para termos de interação não foi usado para atribuir significância aos efeitos, mas sim para identificar fatores interativos que requerem subdivisão para testes de menor ordem (Snedecor e Cochran, 1967).

4. RESULTADOS

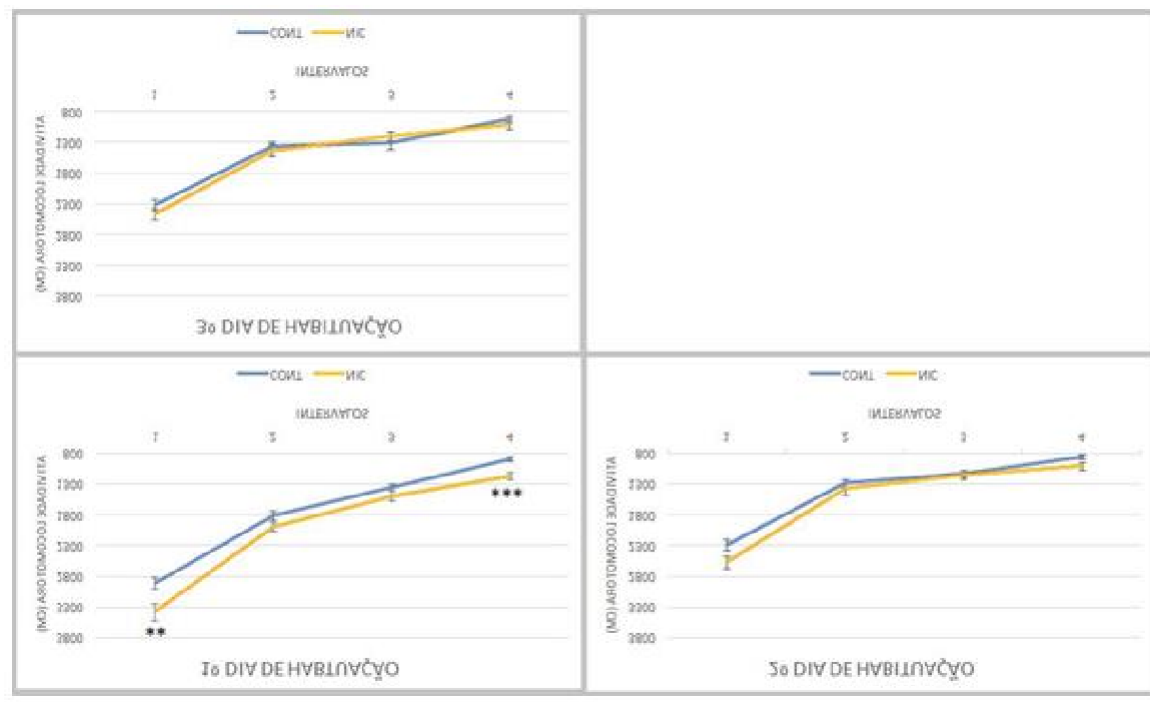
4.1. Resultado da fase de habituação

A rANOVA global para a fase de H, que incluiu Nicotina, Racloprida e Sexo como fatores e Dia e Intervalo como fatores de repetição, revelou que a exposição à Nicotina afetou a locomoção (Nicotina: $F(1,90)=5,2$; $p<0,05$). No entanto, seu efeito variou ao longo dos dias de H (H1aH3 x Nicotina: $F(2,180)=2,9$; $p=0,058$) e ao longo dos intervalos do teste (Intervalo x Nicotina: $F(3,270)=3,9$; $p<0,01$). Uma vez que não houve efeitos ou interações envolvendo Racloprida, este fator foi excluído das análises subsequentes, nas quais cada dia da fase de H foi analisado separadamente por rANOVAs de menor ordem.

4.1.1. Dias da habituação

Os dias de H foram analisados e os dados são apresentados na figura 3. No dia H1 os animais do grupo NIC apresentaram maior atividade locomotora em comparação aos animais do grupo CONT (Nicotina: $F(1,94)=10,8$; $p<0,001$), contudo, esse efeito não foi uniforme durante todo o período de teste (Intervalo x Nicotina: $F(3,282)=2,6$; $p=0,054$). A análise de menor ordem para o H1 através de rANOVA indicou que a hiperatividade induzida pela exposição à Nicotina foi significativa no primeiro (Nicotina: $F(1,94)=8,7$; $p<0,01$) e último (Nicotina: $F(1,94)=16,3$; $p<0,001$) intervalos analisados. O fato da hiperatividade não ter alcançado significância no 2º e 3º intervalos, sugere que o estresse gerado pelas injeções foi capaz de comprometer, nos minutos subsequentes, o efeito da Nicotina sobre a locomoção. As rANOVAs para os dias H2 e H3 não detectaram efeitos ou interações significativas, assim, é possível que a novidade do teste, presente somente em H1, potencialize os efeitos da Nicotina na locomoção.

Figura 3 - Atividade locomotora dos dias de habituação



Legenda: Variação da atividade locomotora dos dias de habituação dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) e daqueles que receberam MBs de água, formando assim, os 2 grupos: CONT (n=50) e NIC (n=48). Valores representam média±EPM. ** $p \leq 0,01$ (NIC > CONT), *** $p \leq 0,001$ (NIC > CONT).
 Fonte: A autora, 2022.

4.1.2. Diferença entre os intervalos

Para investigar se a exposição à Nicotina afetou o processo de habituação ao longo dos intervalos do teste, testes t-pareados foram feitos separadamente para cada grupo e dia. Em todos os dias da fase de H tanto o grupo CONT como o grupo NIC apresentaram redução da atividade locomotora ao longo dos intervalos. Estes dados podem ser observados na tabela 2. Assim, a exposição à Nicotina não foi capaz de alterar a habituação ao ambiente.

Tabela 2 – Comparação da atividade locomotora de cada intervalo da habituação

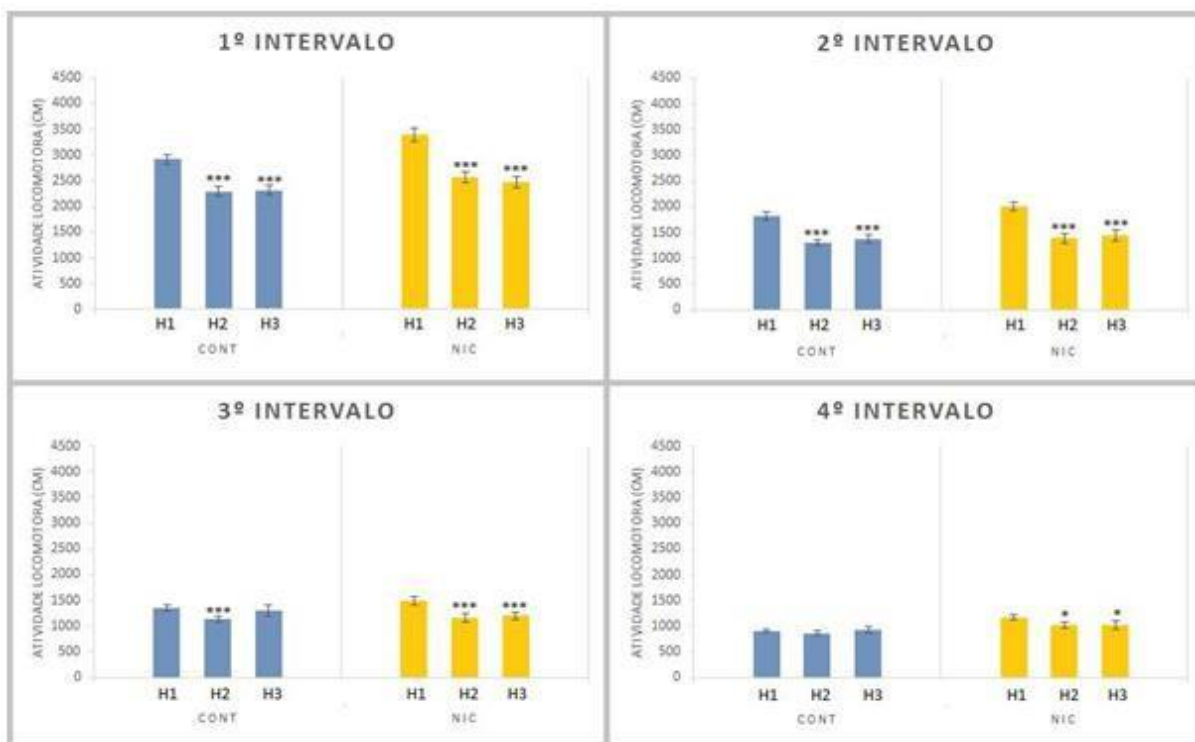
1º DIA DA HABITUAÇÃO								2º DIA DA HABITUAÇÃO							
Grupo	Intervalos			Grupo	Intervalos			Grupo	Intervalos			Grupo	Intervalos		
Cont	1 x	2	p<0,001	Nic	1 x	2	p<0,001	Cont	1 x	2	p<0,001	Nic	1 x	2	p<0,001
		3	p<0,001			3	p<0,001			3	p<0,001			3	p<0,001
		4	p<0,001			4	p<0,001			4	p<0,001			4	p<0,001
	2 x	3	p<0,001		2 x	3	p<0,001		2 x	3	p<0,05		2 x	3	P< 0,01
		4	p<0,001			4	p<0,001			4	p<0,001			4	p<0,001
	3 x	4	p<0,001		3 x	4	p<0,001		3 x	4	p<0,001		3 x	4	NS
3º DIA DA HABITUAÇÃO															
Grupo	Intervalos			Grupo	Intervalos										
Cont	1 x	2	p<0,001	Nic	1 x	2	p<0,001								
		3	p<0,001			3	p<0,001								
		4	p<0,001			4	p<0,001								
	2 x	3	NS		2 x	3	p<0,05								
		4	p<0,001			4	p<0,001								
	3 x	4	p=0,001		3 x	4	p<0,05								

Legenda: tabela sobre a comparação da atividade locomotora de cada intervalo ao longo dos dias de habituação e dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) e daqueles que receberam MBs de água, formando assim, os 2 grupos: CONT (n=50) e NIC (n=48). NS, não-significativo. Valores representam média±EPM.
Fonte: A autora, 2022.

4.1.3. Intervalos por dia

Por fim, testes t-pareados foram utilizados para verificar a habituação ao longo dos dias de teste (H1 a H3). Essa análise foi feita considerando cada intervalo e cada grupo separadamente. Como pode ser observado na figura 4, em relação ao grupo CONT, há redução da atividade do H1 para o H2 nos 3 primeiros intervalos. Não houve redução da atividade entre os dias H2 e H3 para nenhum dos intervalos. Já o grupo NIC apresentou decréscimo na ambulação do H1 para o H2 e também do H1 para H3 em todos os intervalos (p<0,05 em todas as comparações). Similarmente ao identificado no grupo CONT, não houve diferença entre o H2 e H3. Assim, embora ambos tenham apresentado habituação ao longo dos dias, esse efeito parece mais robusto no grupo NIC, possivelmente devido a maior atividade apresentada no início do teste.

Figura 4 – Atividade locomotora por intervalo de habituação



Legenda: Média da atividade locomotora separado por intervalo dos dias de habituação dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) e daqueles que receberam MBs de água, formando assim, os 2 grupos: CONT (n=50) e NIC (n=48). H1, H2 e H3: 1o, 2o e 3o dias de Habituação, respectivamente. Valores representam média±EPM. *** $p \leq 0,001$ (Comparação com H1), * $p \leq 0,05$ (Comparação com H1).

Fonte: A autora, 2022.

Em resumo, a análise estatística da fase de H revelou que a exposição à Nicotina foi capaz induzir hiperatividade locomotora no H1 e que esse efeito foi mitigado pelo estresse. Além disso, a exposição à Nicotina não interferiu no processo de habituação ao ambiente, uma vez que tanto os animais NIC quanto os animais CONT, demonstraram redução da atividade ao longo dos intervalos e ao longo dos dias.

4.2. Resultado da fase de aquisição

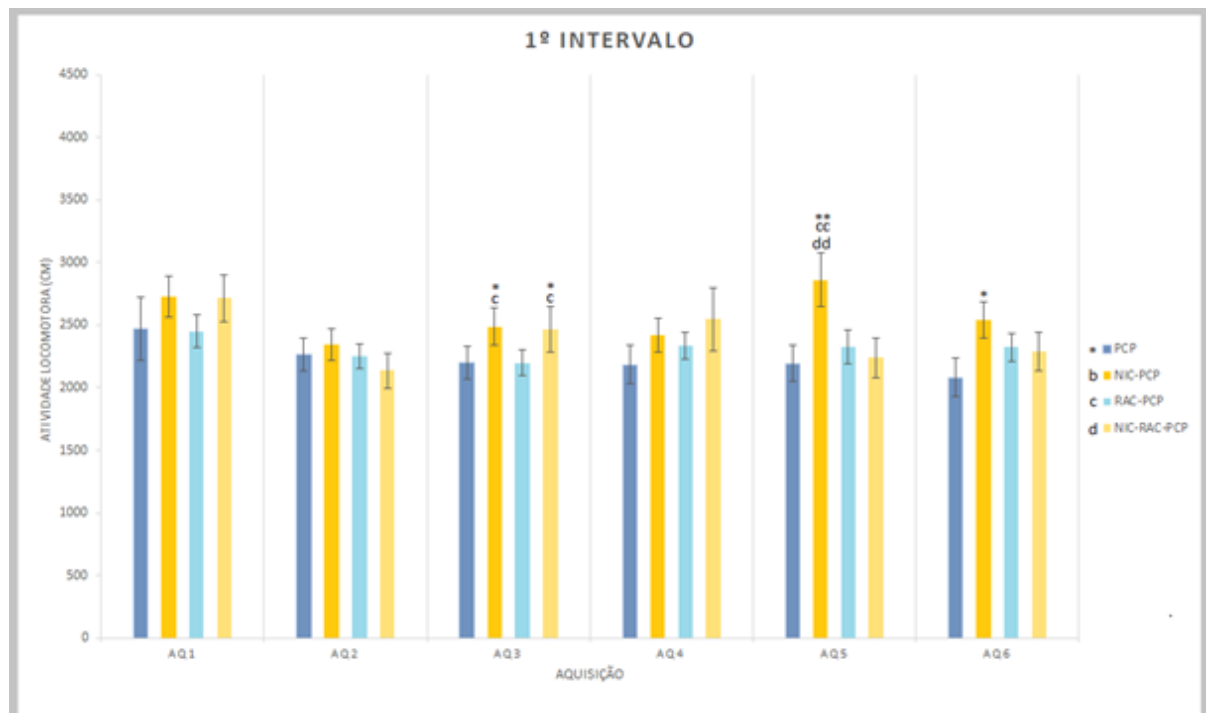
A rANOVA global para a fase de AQ, que incluiu Nicotina, Racloprida e Sexo como fatores e Dia e Intervalo como fatores de repetição, revelou que a exposição à Racloprida afetou a locomoção (Racloprida: $F(1,90)=39,2$, $p < 0,001$). Contudo, esse efeito variou ao longo dos intervalos (Intervalo x Racloprida: $F(3,270)=21,0$, $p < 0,001$), assim como ao longo dos dias de AQ (Dia x Intervalo x Racloprida: $F(15,1350)=1,8$, $p \leq 0,05$). A rANOVA também revelou alteração na locomoção causada pela exposição à Nicotina ao longo dos intervalos (Intervalo x Nicotina: $F(3,270)=3,5$, $p \leq 0,05$), assim como interação entre Nicotina e Racloprida ao longo dos dias e intervalos (Dia x Intervalo x Nicotina x Racloprida: $F(15,1350)=1,6$, $p=0,079$). Os

dados a seguir representam as médias obtidas a partir de valores de machos e fêmeas juntos, uma vez que não foram detectados efeito ou interações consistentes do sexo ao longo dos dias e intervalos com os outros fatores.

4.2.1. Primeiro intervalo da aquisição

Analizamos o primeiro intervalo do teste na figura 5, os 10 minutos iniciais sem administração de injeções, para cada dia. A mANOVA revelou que não houve diferença entre os grupos para os dias AQ1, AQ2, e AQ4. No dia AQ3 os animais que foram expostos a Nicotina apresentaram maior atividade locomotora em comparação aos animais não expostos (Nicotina: $F(1,90)=4,3$; $p\leq 0,05$). Em AQ5 (Nicotina x Racloprida: $F(1,90)=6,1$, $p\leq 0,05$), o grupo NIC-PCP foi mais ativo que os demais grupos, enquanto que em AQ6 (Nicotina x Racloprida: $F(1,90)=3,7$, $p=0,058$), o grupo NIC-PCP foi mais ativo que o grupo PCP. Apesar dos grupos que receberam Nicotina serem diferentes dos que receberam MB com água desde o início dos testes, essa diferença só é evidente no H1, e o fato dela se apresentar novamente apenas em AQ3, e depois em AQ5 e AQ6, pode indicar que essa droga interagindo com outras drogas pode potencializar o seu efeito.

Figura 5 - Atividade locomotora do 1º intervalo da AQ



Legenda: Atividade locomotora do 1º intervalo (10 minutos) dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água. Neste intervalo, os animais ainda não receberam injeções de Racloprida (RAC) ou salina e de Fenciclidina (PCP). contudo, no gráfico, já há a separação entre os 4 grupos: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-

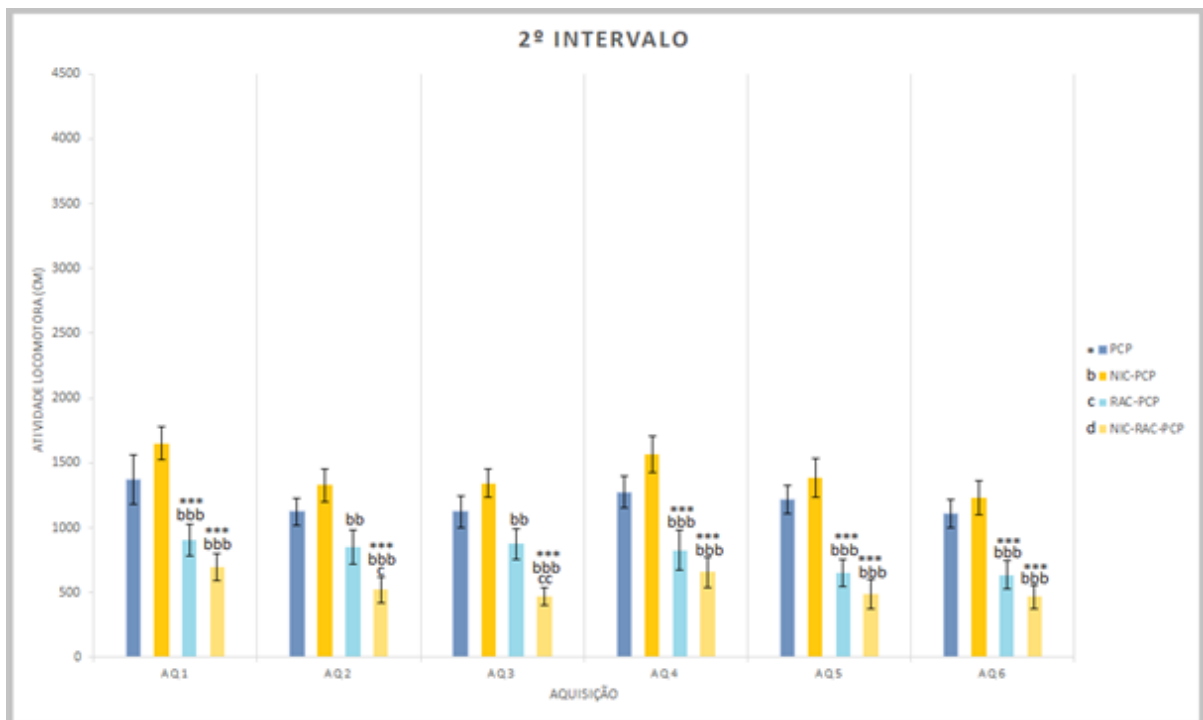
PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5 e AQ6: 1o, 2o, 3o, 4o, 5o e 6o dias de Aquisição, respectivamente. Valores representam média±EPM. * c p>0.05, ** cc dd p>0.01; *: diferente de PCP, b: diferente de NIC-PCP, c: diferente de RAC-PCP, d: diferente de NIC-RAC-PCP.

Fonte: A autora, 2022.

4.2.2. Segundo Intervalo da Aquisição

Analizamos o segundo intervalo do teste na figura 6, 10 minutos após a administração de injeções de Racloprida ou Salina, para cada dia. Os animais que receberam Racloprida apresentaram menor atividade locomotora em comparação aos animais que não receberam, e esse resultado se repete em todos os dias (Racloprida: AQ1 - $F(1,90)=24,9$, $p<0,001$; AQ2 - $F(1,90)=21,5$, $p<0,001$; AQ3 - $F(1,90)=28,8$, $p<0,001$; AQ4 - $F(1,90)=26,1$, $p<0,001$; AQ5 - $F(1,90)=37,8$, $p<0,001$; AQ6 - $F(1,90)=32,5$, $p<0,001$). O efeito hipolocomotor causado pela Racloprida indica o importante papel desempenhado pelo receptor D2 na ambulação. Pra os dias AQ2 e AQ3, este intervalo também revelou que animais pré expostos a Nicotina, quando expostos a Racloprida, tiveram um efeito de hipolocomoção mais intenso que animais que não foram expostos a Nicotina (Nicotina x Racloprida: AQ2 - $F(1,90)=5,6$, $p<0,05$; AQ3 - $F(1,90)=9,6$, $p<0,01$).

Figura 6 - Atividade locomotora do 2º intervalo da AQ



Legenda: Média da atividade locomotora do 2º intervalo (10 minutos) dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, e receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina. Neste intervalo, os animais ainda não receberam injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), contudo, no gráfico, já há a separação entre os 4 grupos: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5 e AQ6: 1o, 2o, 3o, 4o, 5o e 6o dias Aquisição, respectivamente. Valores representam

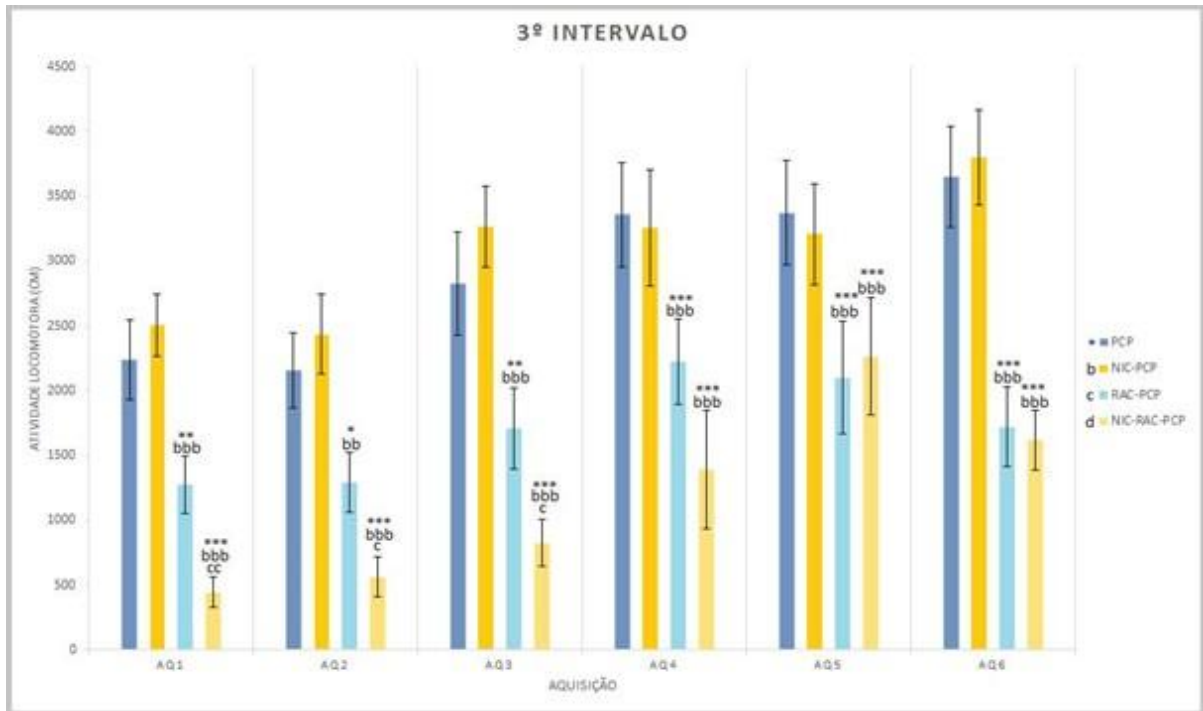
média±EPM. ** **bb cc dd** $p > 0.01$, *** **bbb ccc ddd** $p > 0.001$; *: diferente de PCP, b: diferente de NIC-PCP, c: diferente de RAC-PCP, d: diferente de NIC-RAC-PCP.

Fonte: A autora, 2022.

4.2.3. Terceiro intervalo de aquisição

Na figura 7 analisamos o terceiro intervalo do teste, os 10 minutos subsequentes a administração de Fenciclidina, para cada dia. A análise estatística indicou efeito da exposição à Racloprida para todos os dias de AQ (Racloprida: AQ1 - $F(1,90)=40,7$, $p < 0,001$; AQ2 - $F(1,90)=27,6$, $p < 0,001$; AQ3 - $F(1,90)=32,4$, $p < 0,001$; AQ4 - $F(1,90)=13,1$, $p < 0,001$; AQ5 - $F(1,90)=6,6$, $p \leq 0,05$; AQ6 - $F(1,90)=40,0$, $p < 0,001$). Esse efeito mostra que, assim como no 2º intervalo, os grupos expostos a Racloprida foram menos ativos que aqueles não-expostos, mostrando que a Fenciclidina não foi capaz de evitar a ação da Racloprida. Além disso, a Nicotina interagiu com a Racloprida em AQ1 (Nicotina x Racloprida: $F(1,90)=5,4$, $p \leq 0,05$), AQ2 (Nicotina x Racloprida: $F(1,90)=3,9$, $p \leq 0,05$) e AQ3 (Nicotina x Racloprida: $F(1,90)=4,4$, $p \leq 0,05$). As interações acima podem ser explicadas pelo fato de, nos 3 primeiros dias de AQ, além dos grupos expostos a Racloprida se mostrarem menos ativos que os grupos não-expostos, o grupo NIC-RAC-PCP mostrar menor atividade locomotora que o grupo RAC-PCP, sugerindo que a Nicotina potencializa o efeito inibidor da Racloprida mesmo na presença de Fenciclidina, mas que este efeito não persiste por todo o período de AQ.

Figura 7 - Atividade locomotora do 3º intervalo da AQ



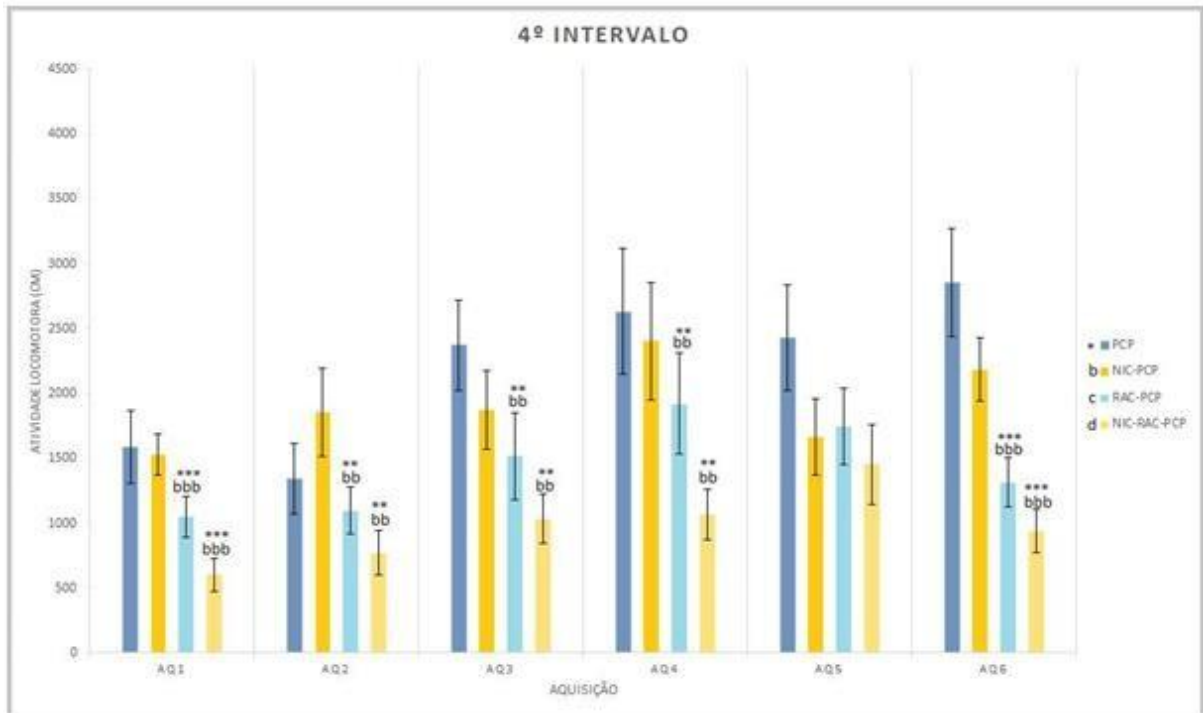
Legenda: Média da atividade locomotora do 3º intervalo (10 minutos) dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, que receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina, e injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), formando assim, os 4 grupos: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5 e AQ6: 1o, 2o, 3o, 4o, 5o e 6o dias de Aquisição, respectivamente. Valores representam média±EPM. * b c d p>0.05, **bb cc dd p>0.01, *** bbb ccc ddd p>0.001; *: diferente de PCP, b: diferente de NIC-PCP, c: diferente de RAC-PCP, d: diferente de NIC-RAC-PCP.

Fonte: A autora, 2022.

4.2.4. Quarto intervalo de aquisição

A análise estatística diária do quarto intervalo do teste, 30 minutos finais após a administração de injeções de Fenciclidina, mostrou que o efeito da Racloprida se manteve para os dias AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ6 (Racloprida: AQ1 - $F(1,90)=14,2$, $p<0,001$; AQ2 - $F(1,90)=6,6$, $p\leq 0,05$; AQ3 - $F(1,90)=7,8$, $p\leq 0,05$; AQ4 - $F(1,90)=6,7$, $p\leq 0,05$; AQ6 - $F(1,90)=24,3$, $p<0,001$), e não há mais diferença entre os grupos NIC-RAC-PCP e RAC-PCP. Isso indica que a droga Racloprida possui uma ação com duração prolongada, enquanto que a Nicotina interage de forma pontual. Isso é percebido através da análise da figura 8 a baixo.

Figura 8 - Atividade locomotora do 4º intervalo da AQ



Legenda: Média da atividade locomotora do 4º intervalo (30 minutos) dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, que receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina, e injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), formando assim, os 4 grupos: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). AQ1, AQ2, AQ3, AQ4, AQ5 e AQ6: 1o, 2o, 3o, 4o, 5o e 6o dias de Aquisição, respectivamente. Valores representam média±EPM. ** bb cc dd p>0.01, *** bbb ccc ddd p>0.001; *: diferente de PCP, b: diferente de NIC-PCP, c: diferente de RAC-PCP, d: diferente de NIC-RAC-PCP.

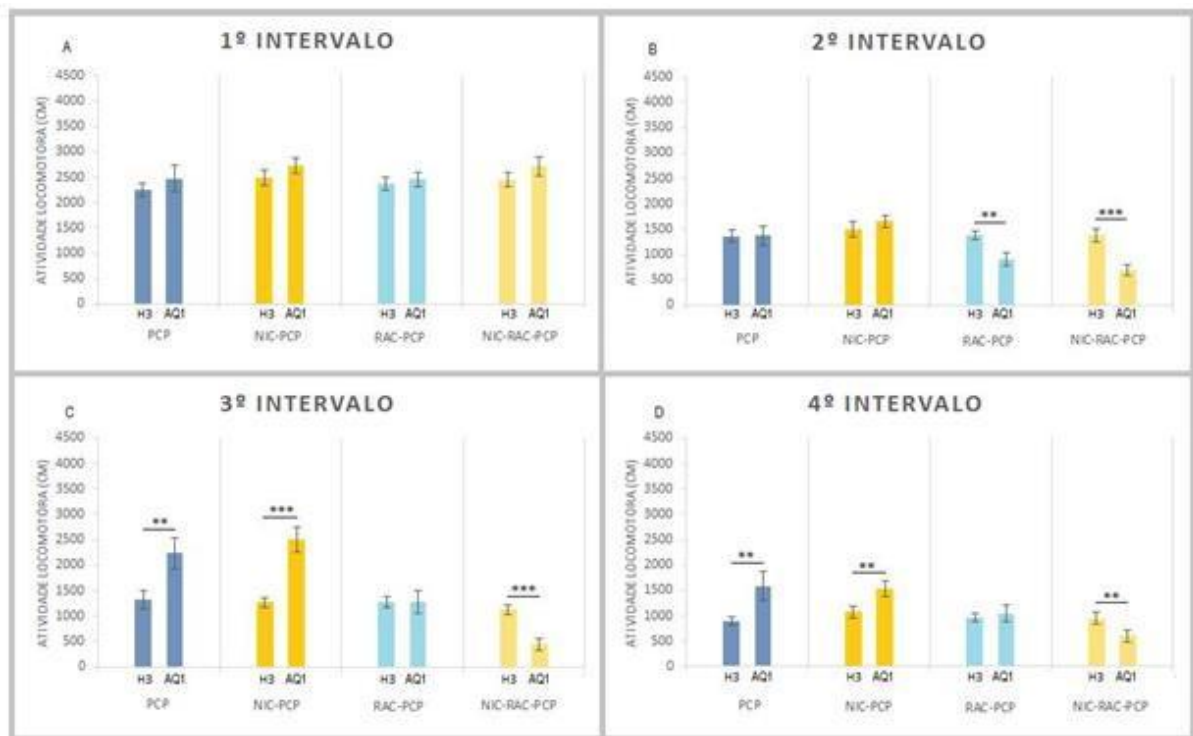
Fonte: A autora, 2022.

4.3. Comparação de H3 com AQ1

Para podermos verificar a reação imediata de cada grupo em resposta a Fenciclidina, Racloprida e Nicotina, e como essas drogas interagem em um primeiro momento, fizemos a comparação entre os dias H3 (terceiro dia de habituação) e AQ1 (primeiro dia de aquisição). Para isso fizemos uma rANOVA seguida de teste t. A ANOVA usou Nicotina, Racloprida e Sexo como fatores, e como fatores de repetição, Dia e Intervalo. Essa análise revelou que a Racloprida causou efeito na locomoção (Racloprida: $F(1,90)=18,8$, $p\leq 0,001$), e que esse efeito variou ao longo dos intervalos (Intervalo x Racloprida: $F(3,270)=11,7$, $p<0,001$) e em cada dia (Dia x Racloprida: $F(1,90)=21,5$, $p\leq 0,001$) e também variou entre os intervalos de cada dia (Dia x Intervalo x Racloprida: $F(3,270)=10,9$, $p\leq 0,001$). Além do efeito da Racloprida, essa análise revelou variação do efeito da Nicotina ao longo dos intervalos (Intervalo x Nicotina: $F(3,270)=3,2$, $p\leq 0,05$). Houve interação entre Nicotina e Racloprida (Nicotina x Racloprida: $F(1,900)=3,7$, $p=0,059$). E por último, ocorreu interação dia com intervalo (Dia x Intervalo: $F(3,270)=9,8$, $p\leq 0,001$).

Quando analisamos o teste t, como mostra na figura 9, para o 1º intervalo não houve diferença entre os grupos. Isso é justificável pois, até esse momento os grupos não mudam de um dia para o outro, e não receberam nem Racloprida ou Fenciclidina para justificar um efeito residual. E como já mostrado nos resultados sobre a habituação, no 3º dia, a Nicotina sozinha não está mais causando efeito na locomoção. Já no segundo intervalo, os grupos RAC-PCP e NIC-RAC-PCP, tiveram redução da atividade de um dia para o outro, mostrando o efeito da Racloprida de reduzir a atividade. Nos terceiro e quarto intervalos ocorre aumento da atividade para os grupos PCP e NIC-PCP, e redução no grupo RAC-PCP. Esses resultados mostram que a Fenciclidina foi capaz de causar hiperlocomoção. No grupo NIC-RAC-PCP, o efeito inibitório da Racloprida foi acentuado pela Nicotina.

Figura 9 - Comparando H com AQ1



Legenda: Atividade locomotora separado por intervalo comparando o 3º dia de habituação (H3) com o 1º dia de aquisição (AQ1) dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, que receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina, e injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), formando assim, os 4 grupos: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). Valores representam média±EPM. **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2022.

4.4. **Desenvolvimento da sensibilização locomotora**

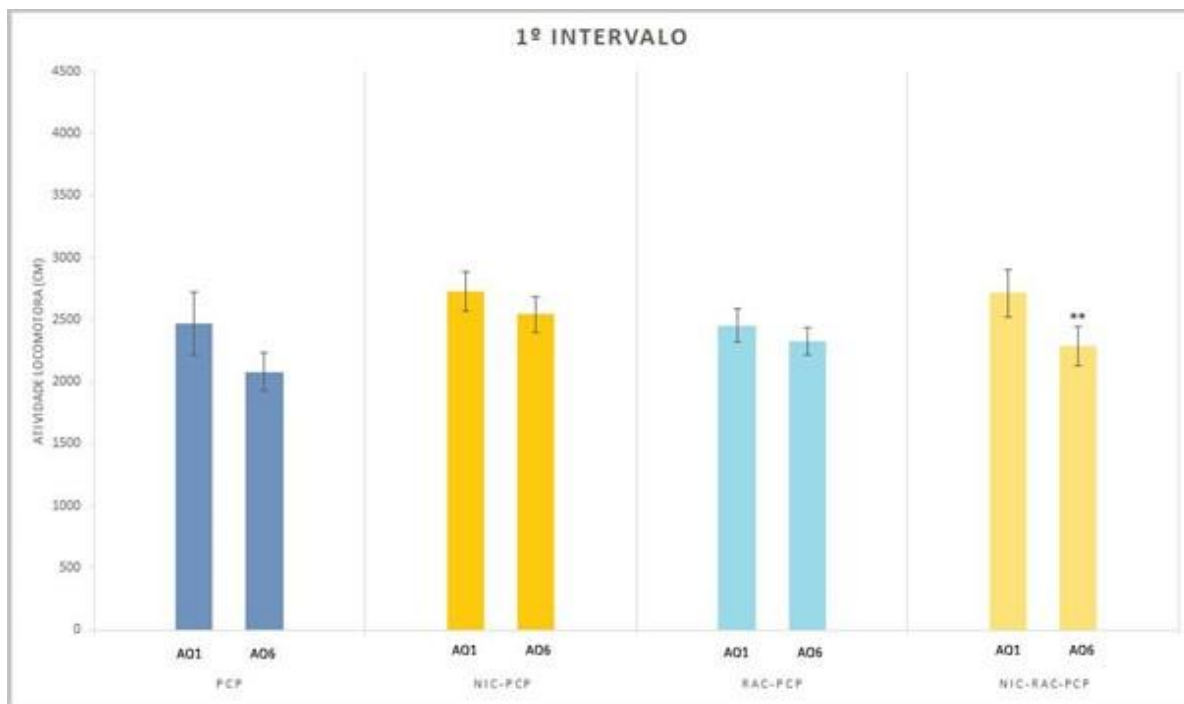
A fim de avaliar se a Fenciclidina foi capaz de causar o aumento progressivo da atividade locomotora nos animais, o que caracteriza o fenômeno de sensibilização, e se a Racloprida e a Nicotina interferiram nesse processo, foram feitas análises comparando o AQ6 com o AQ1. Foi feita uma rANOVA tendo como fatores Nicotina, Racloprida e Sexo e fatores de repetição, Dia e Intervalo. Essas foram seguidas por rANOVAS de menor ordem quando foram analisados cada intervalo em separado e, quando pertinente, o comportamento de cada grupo ao longo dos dias de AQ foi analisado por teste t.

A rANOVA revelou efeito de dia, efeito da Racloprida, efeito da Racloprida variando nos dois dias, da Racloprida variando ao longo dos intervalos e também nos dois dias, assim como a Nicotina variando nos intervalos e Nicotina interagindo com Racloprida variando ao longo dos intervalos e dos dois dias (Dia: $F(1,90)=48,7$, $p<0,001$; Racloprida: $F(1,90)=11,9$, $p<0,001$; Dia x Racloprida: $F(1,90)=2,8$, $p=0,097$; Intervalo x Nicotina: $F(3,270)=3,4$, $p\leq 0,05$; Intervalo x Racloprida: $F(3,270)=27,5$, $p<0,001$; Dia x Intervalo x Racloprida: $F(3,270)=3,4$, $p\leq 0,05$; Dia x intervalo x Nicotina x Racloprida: $F(3,270)=2,2$, $p=0,091$).

4.4.1. Comparação do primeiro intervalo

Como visto na figura 10, no 1º intervalo, a análise apontou efeito do dia (Dia: AQ1 x AQ6 - $F(1,90)=10,0$, $p\leq 0,01$). Os Teste t apontaram redução da atividade locomotora do grupo NIC-RAC-PCP de AQ1 para AQ6.

Figura 10 - Atividade locomotora do 1º intervalo AQ1xAQ6



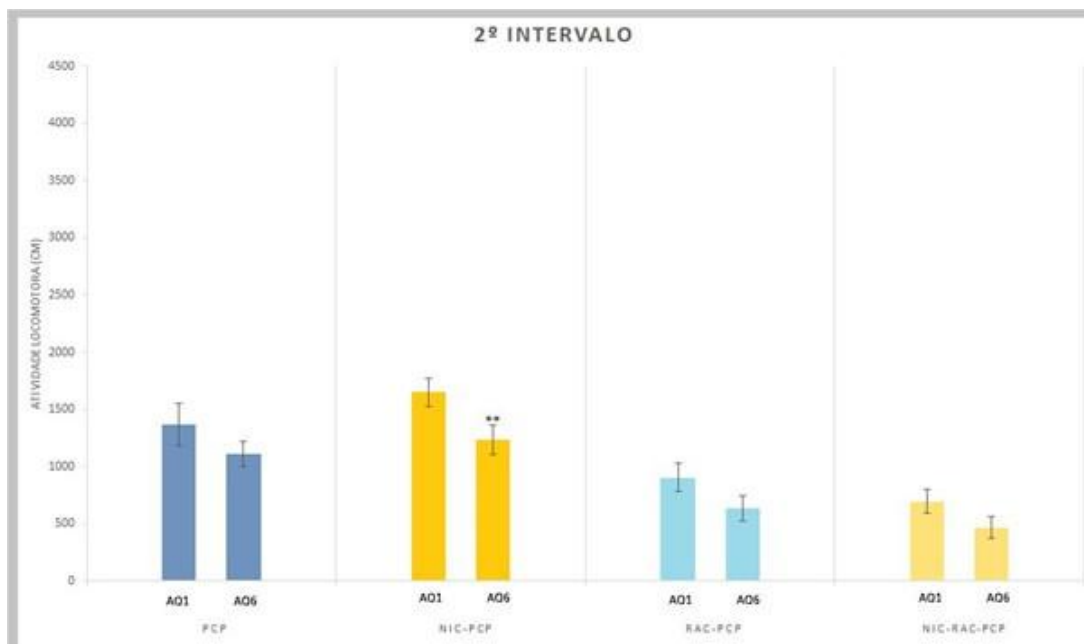
Legenda: Atividade locomotora do 1º intervalo (10 minutos) do 6º dia (AQ6) comparados com o 1º (AQ1) dia da fase de Aquisição dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água. Neste intervalo, os animais ainda não receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina e de Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), contudo, no gráfico, já há a separação entre os 4 grupos: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). Valores representam média±EPM. **: $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2022.

4.4.2. Comparação do segundo intervalo

Durante o segundo intervalo, como indica o figura 11, o efeito da Racloprida ficou evidente (Racloprida: AQ1 x AQ6 - $F(1,90)=41,8$, $p \leq 0,001$) e também sua co-exposição com a Nicotina (Nicotina: AQ1 x AQ6 - $F(1,90)=3,9$, $p \leq 0,05$). Os Teste t mostraram redução da atividade locomotora no grupo NIC-PCP em AQ6 quando comparado com AQ1.

Figura 11 - Atividade locomotora do 2º intervalo AQ1xAQ6



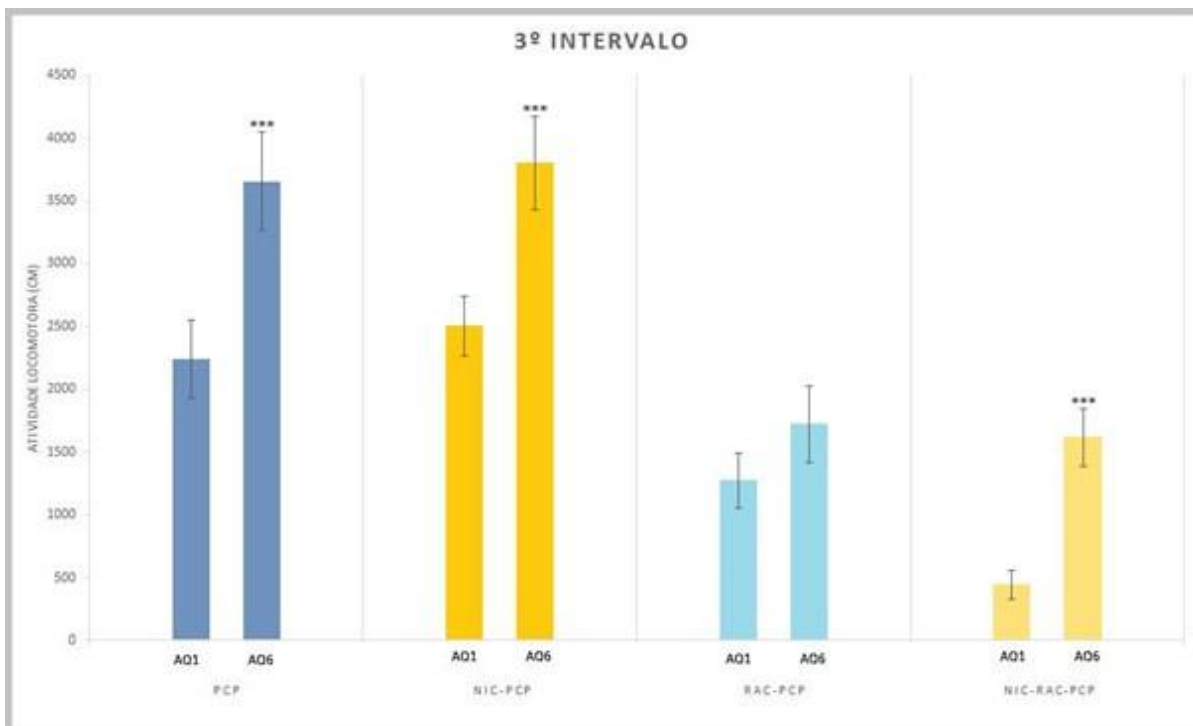
Legenda: Atividade locomotora do 2º intervalo (10 minutos) do 6º dia (AQ6) comparados com o 1º dia da fase de Aquisição (AQ1) dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, e receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina. Neste intervalo, os animais ainda não receberam injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), contudo, no gráfico, já há a separação entre os 4 grupos: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). Valores representam média±EPM. **: $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2022.

4.4.3. Comparação do terceiro intervalo

Quando analisado o 3º intervalo, demonstrado na figura 12, logo após a administração de Fenciclidina, a rANOVA apontou o efeito da Racloprida (Racloprida: AQ1 x AQ6 - $F(1,90)=59,5$, $p \leq 0,001$) e do dia (Dia: AQ1 x AQ6 - $F(1,90)=42,8$, $p \leq 0,01$). Os teste t apontaram aumento na locomoção para os grupos PCP, NIC-PCP e NIC-RAC-PCP em AQ6 quando comparado com AQ1.

Figura 12 - Atividade locomotora do 3º intervalo AQ1xAQ6



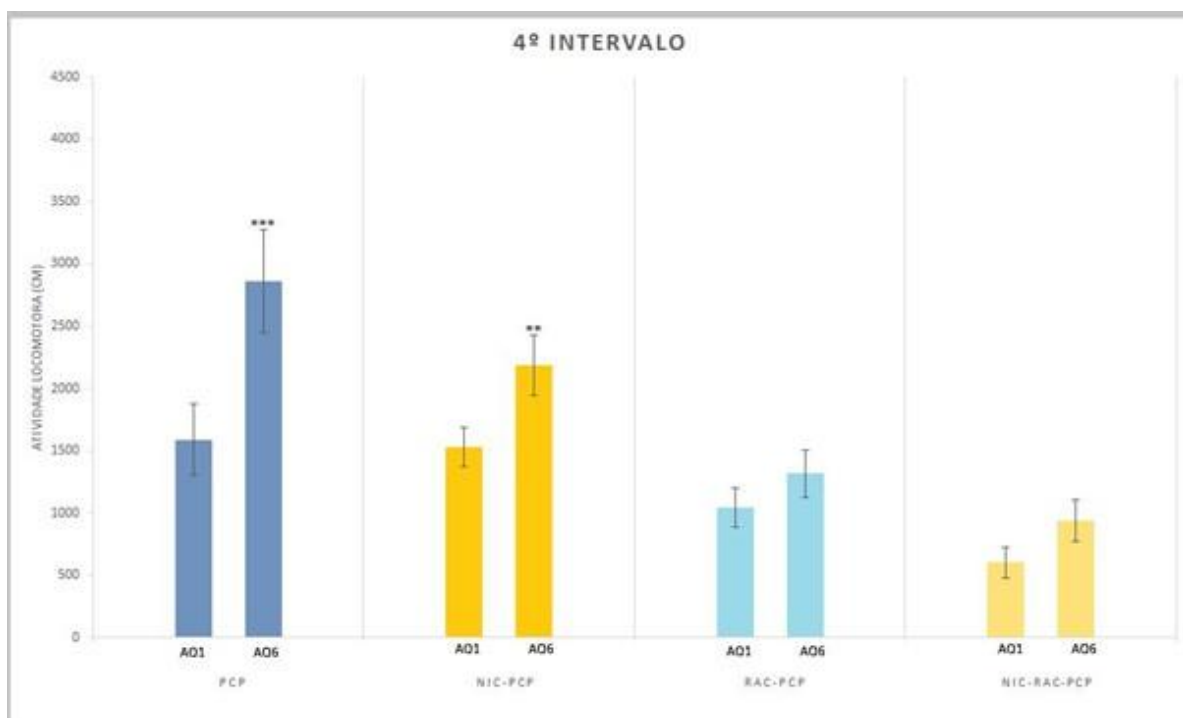
Legenda: Atividade locomotora do 3º intervalo (10 minutos) do 6º dia (AQ6) comparados com o 1º dia da fase de Aquisição (AQ1) dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, que receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina, e injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), formando assim, os 4 grupos: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). Valores representam média±EPM. ***: $p \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2022.

4.4.4. Comparação do quarto intervalo

Indicado no figura 13, no 4º intervalo, da mesma forma que no 3º intervalo, a rANOVA aponta efeito da Racloprida (Racloprida: AQ1 x AQ6 - $F(1,90)=27,9$, $p \leq 0,001$). também apontou efeito de dia (Dia: AQ1 x AQ6 - $F(1,90)=42,8$, $p \leq 0,01$). Os teste t apontaram aumento da atividade dos grupos PCP e NIC-PCP entre AQ1 e AQ6.

Figura 13 - Atividade locomotora do 4º intervalo AQ1xAQ6



Legenda: Média da atividade locomotora do 4º intervalo (30 minutos finais) do 6º dia (AQ6) comparados com o 1º dia da fase de Aquisição (AQ1) dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, que receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina, e injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), formando assim, os 4 grupos: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). Valores representam média±EPM. **: $p \leq 0,01$. ***: $p \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2022.

Quando analisamos o 3º e 4º intervalos ao longo dos dias de AQ, identificamos aumento da atividade locomotora logo após a 1ª administração de Fenciclidina, assim como aumento progressivo ao longo dos dias, o que indica o desenvolvimento de sensibilização dos grupos PCP e NIC-PCP. O grupo NIC-RAC-PCP apresentou aumento de AQ1 para AQ6, porem esse aumento é justificado pelo hipoatividade desse grupo em AQ1, por tanto os grupos expostos a Racloprida não sensibilizam.

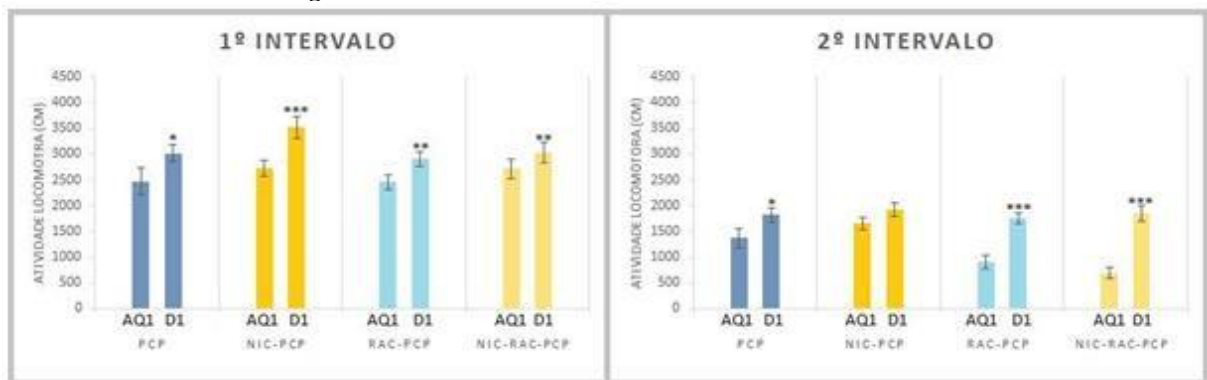
4.5. Teste de sensibilização

Para avaliar a expressão da sensibilização locomotora, após AQ e após 5 dias de retirada das drogas, metade dos camundongos de cada grupo experimental foram desafiados com Nicotina (0,5mg/Kg, sc) e a outra metade com Fenciclidina (10mg/Kg, sc) imediatamente antes do 3º intervalo do teste. Assim, o fator Desafio foi considerado apenas na análise dos 2 últimos intervalos (intervalos 3 e 4).

4.5.1. Primeiro e segundo intervalos

A rANOVA que considerou os intervalos 1 e 2 como medida repetida indicou que os camundongos foram mais ativos no primeiro intervalo quando comparados ao segundo independente de tratamentos medicamentosos prévios (Intervalo: $F(1,90)=284,3$, $p<0.001$). A análise comparativa de AQ1 e D demonstrou ainda um perfil mais ativo em D (Dia: $F(1,90)=57,7$, $p<0.001$). como podemos observar na figura 14, no primeiro intervalo, todos os 4 grupos experimentais foram mais ativos em D. O aumento da atividade exploratória pode ser devido ao intervalo de retirada de 5 dias, durante o qual os camundongos não foram testados no CA. No segundo intervalo, a atividade aumentada em D ainda era evidente em camundongos PCP, mas não em camundongos NIC-PCP. Camundongos expostos a Racloprida durante AQ não eram mais hipoativos em D, o que indica que não houve efeitos inibitórios residuais desta droga na linha de base de D.

Figura 14 - Atividade locomotora do desafio 1º e 2º intervalo



Legenda: Atividade locomotora no CA durante o primeiro (esquerdo) e segundo (direito) intervalo de 10 minutos do teste de Sensibilização (D) e valores comparativos no primeiro dia de Aquisição (AQ1). O D ocorreu após 5 dias de retirada, durante os quais os camundongos não foram expostos a drogas e não foram testados em CA. Nos dois intervalos D 1 e 2, os animais ainda não receberam desafios de Fenciclidina ou Nicotina. Os grupos analisados, gerados anteriormente, são dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, que receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina, e injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), sendo eles: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). Valores representam média±EPM. *: $p\leq 0,05$. **: $p\leq 0,01$. ***: $p\leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2022.

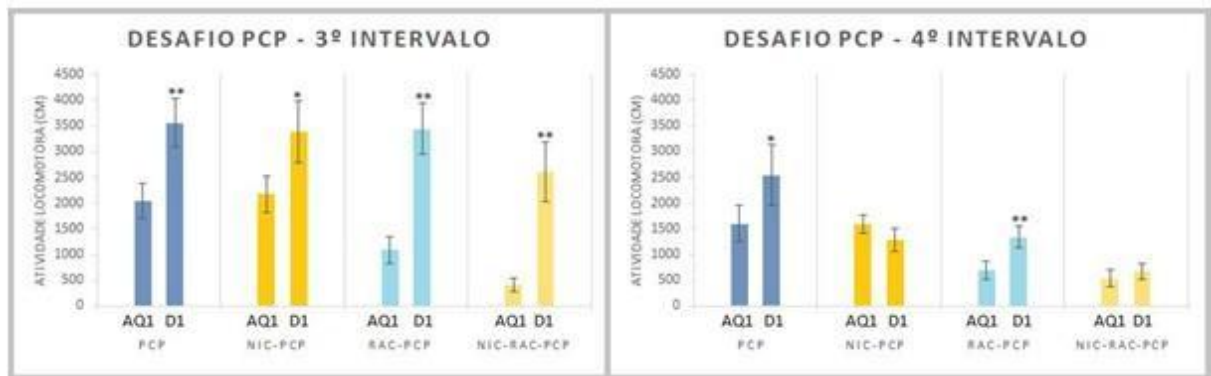
4.5.2. Terceiro e quarto intervalos

A análise global de rANOVA que considerou os intervalos 3 e 4 como medida repetida comparando as atividades locomotoras de AQ1 e D foi seguida por ANOVAs de menor ordem em cada desafio e intervalo.

O desafio com Fenciclidina teve um grande impacto na locomoção (Terceiro intervalo: Dia: $F(1,41)=42,5$, $p<0,001$; Racloprida: $F(1,41)=6,8$, $p=0,012$; Quarto intervalo: Dia: $F(1,41)=5,7$, $p=0,022$; Racloprida: $F(1,41)=9,8$, $p=0,003$; Dia x Nicotina: $F(1,41)=9,0$, $p=0,005$):

como visto na figura 15, camundongos PCP eram hiperativos em D quando comparado ao AQ1, efeito identificado tanto no terceiro quanto no quarto intervalo, caracterizando a expressão da sensibilização locomotora. Camundongos RAC-PCP também foram hiperativos em D quando comparados a AQ1 em ambos os intervalos, embora o aumento na locomoção tenha sido menos robusto no quarto intervalo. A análise longitudinal também demonstrou que a exposição prévia à Nicotina teve um impacto inibitório na atividade aumentada pelo desafio com Fenciclidina, que foi mais evidente durante o quarto intervalo para camundongos NIC-PCP e NIC-RAC-PCP e impediu a expressão da sensibilização locomotora.

Figura 15 - Atividade locomotora do desafio de PCP 3º e 4º intervalo

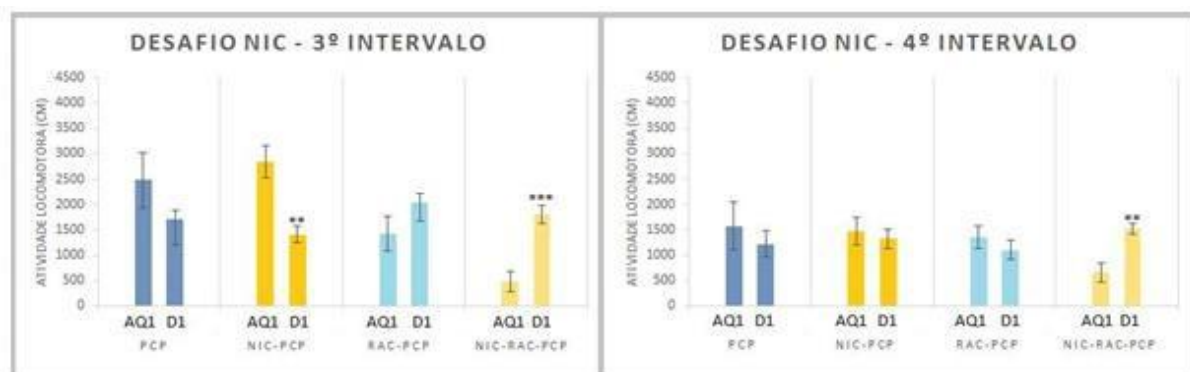


Legenda: Atividade locomotora no CA durante o terceiro intervalo de 10 minutos (esquerdo) e media do quarto intervalo de 30 minutos (direito) do teste de Sensibilização (D) e valores comparativos no primeiro dia de Aquisição (AQ1). No terceiro intervalo do AQ1, todos os camundongos receberam Fenciclidina (10 mg/Kg, s.c.) imediatamente antes de serem colocados no OF. Em D, os ratos receberam um desafio Fenciclidina após um período de retirada de 5 dias. Os grupos analisados, gerados anteriormente, são dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, que receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina, e injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), sendo eles: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). Valores representam média±EPM. *: $p \leq 0,05$. **: $p \leq 0,01$. ***: $p \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2022.

O impacto do desafio com Nicotina, demonstrado no figura 16, foi leve quando comparado ao desafio com Fenciclidina tanto no terceiro intervalo (Racloprida: $F(1,41)=7,2$, $p=0,01$; Dia x Racloprida: $F(1,41)=16,3$, $p<0,001$) quanto no quarto intervalo (Dia x Nicotina: $F(1,41)=4,1$, $p=0,050$; Dia x Racloprida: $F(1,41)=3,0$, $p=0,092$). Não houve diferenças significativas entre AQ1 e D para camundongos PCP e RAC-PCP. Enquanto a atividade dos camundongos NIC-PCP foi diminuída durante o terceiro intervalo de D quando comparado ao AQ1, esse efeito foi transitório e não mais evidente durante o quarto intervalo. Distintamente, camundongos NIC-RAC-PCP foram mais ativos durante o terceiro intervalo de D quando comparado ao AQ1, e esse efeito persistiu no quarto intervalo.

Figura 16 - Atividade locomotora do desafio de NIC 3º e 4º intervalo



Legenda: Atividade locomotora no CA durante o terceiro intervalo de 10 minutos (esquerdo) e media do quarto intervalo de 30 minutos (direito) do teste de Sensibilização (D) e valores comparativos no primeiro dia de Aquisição (AQ1). No terceiro intervalo do AQ1, todos os camundongos receberam Fenciclidina (10 mg/Kg, s.c.) imediatamente antes de serem colocados no OF. Em D, os ratos receberam um desafio Nicotina (0,5 ml/Kg) após um período de retirada de 5 dias. Os grupos analisados, gerados anteriormente, são dos animais expostos à Nicotina (NIC: 24mg/Kg/dia, MBs) ou água, que receberam injeções de Racloprida (RAC: 0,25mg/kg, s.c.) ou salina, e injeções Fenciclidina (PCP: 10mg/kg, s.c.), sendo eles: PCP (n=26), NIC-PCP (n=24), RAC-PCP (n=24) e NIC-RAC-PCP (n=24). Valores representam média±EPM. *: $p \leq 0,05$. **: $p \leq 0,01$. ***: $p \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2022.

5. **DISCUSSÃO**

Nossos resultados mostram hiperlocomoção induzida pela Fenciclidina, estando alinhados com estudos anteriores que mostram aumento da atividade locomotora induzida por Fenciclidina aguda e subcrônica em adolescentes (Kusljic et al., 2022). Existe uma associação entre SCHZ e o uso da Nicotina durante a adolescência (Mustonen et al, 2018), sendo este um período de transição na SCHZ, quando ocorrem os primeiros sintomas psicóticos que marcam o diagnóstico do transtorno (Häfner et al, 2019), e de maior suscetibilidade à Nicotina (Abreu-Villaça et al, 2017). Porém poucos estudos mostram os efeitos da exposição à Nicotina em modelos de SCHZ na adolescência. Como resultado, nosso estudo mostrou que o curto período de exposição à Nicotina nos animais durante o período da adolescência não alterou o impacto imediato produzido pela exposição à Fenciclidina na atividade locomotora dos animais. Porém, a Nicotina mostrou interação com a Racloprida, potencializando o efeito de hipolocomoção nos camundongos tratados com Fenciclidina. Os animais tratados com Racloprida não foram capazes de desenvolver sensibilização locomotora, a Nicotina mantém este quadro, não aumentando a atividade em AQ6 e reduzindo em AQ1. Este resultado indica que os sintomas semelhantes a SCHZ produzidos pela exposição a fenciclidina, não apresentam melhora ou piora causada pela exposição previa da Nicotina, porém, pode causar maior alívio dos sintomas quando associada a um antagonista D2.

5.1. **Fenciclidina (PCP)**

Nossos resultados mostram que a Fenciclidina foi capaz de causar hiperatividade locomotora nos animais desde o primeiro dia da administração, como demonstrado através da comparação de H3 com AQ1. A administração de Fenciclidina imediatamente antes do 3o intervalo induz o desenvolvimento da sensibilização nos grupos PCP e NIC-PCP, como demonstrado pela comparação entre AQ1 e AQ6, corroborando as descobertas recentes de nosso laboratório em camundongos adolescentes (Dutra-Tavares et al., 2021). Estudos anteriores estão de acordo com os nossos resultados demonstrando que a administração sistêmica aguda de antagonistas de receptores NMDA induz, em roedores, hiperlocomoção (Homayoun et al., 2004) que é potencialmente compatível com sintomas positivos da SCHZ (Sams-Dodd, 1997). O desafio com Fenciclidina causou hiperatividade locomotora logo após a administração da droga mesmo após 5 dias de retirada, deixando evidente a expressão da sensibilização locomotora induzida por Fenciclidina. Mesmo esse efeito sendo menos intenso no intervalo 4, esse dado corrobora evidências anteriores de que camundongos expostos à Fenciclidina durante a adolescência expressam sensibilização locomotora (Freeman et al., 2017; Qiao et al., 2014), e sugere que os mecanismos que levam a esse efeito hiperlocomotor podem ser prontamente ativados mesmo após um período de retirada da droga.

Apesar do papel estabelecido dos receptores de NMDA nos processos de plasticidade sináptica (Hardingham, 2019), os mecanismos pelos quais a exposição repetida a Fenciclidina causa sensibilização locomotora não são totalmente compreendidos. No entanto, é consenso que, semelhante ao descrito em pacientes com SCHZ (Goff e Coyle, 2001; Lin et al., 2012), os efeitos da Fenciclidina incluem a desregulação da transmissão mesolímbica de dopamina (Carlezon e Wise, 1996; Kohli et al., 2019), portanto, a hiperatividade gerada pela Fenciclidina (observado pela comparação de H3 e AQ1) pode ser explicada por uma estimulação dopaminérgica (Bowyer et al., 1984). Os aumentos induzidos por drogas na liberação de dopamina no NAcc (Di Chiara e Imperato, 1988) têm sido intimamente implicados na hiperatividade induzida por drogas, e a sensibilização locomotora foi encontrada associada a um aumento da capacidade das drogas de aumentar a atividade dopaminérgica mesolímbica (Kalivas e Stewart, 1991; Pierce e Kalivas, 1997; Vanderschuren e Kalivas, 2000).

5.2. **Racloprida (RAC)**

A racloprida é um antagonista dos receptores D2 de dopamina (Farde et al., 1986) e gera um efeito hipolocomotor quando administrada em camundongos (Ogren e Goldstein, 1994).

Portanto, seu uso serviu para avaliar o envolvimento dos receptores D2 nos efeitos hiperlocomotores provocados pela Fenciclidina (Qiao et al., 2014). Em relação aos camundongos RAC-PCP, a Racloprida impediu o aumento de a atividade locomotora observada nos grupos PCP e NIC-PCP e impediu o desenvolvimento de sensibilização locomotora provocada pela Fenciclidina. Em NIC-RAC-PCP não vemos uma sensibilização apesar do aumento de AQ1 para AQ6. Esse aumento é justificado pelo efeito hipolocomotor em AQ1 causado pela coexposição de Racloprida e Nicotina. No entanto, em AQ6 esse efeito é perdido e a ambulação de NIC-RAC-PCP se iguala ao grupo de RAC-PCP, que por sua vez não demonstrou diferença entre AQ1 e AQ6. Sabe-se que a fase de desenvolvimento da sensibilização está associada a alterações adaptativas neuronais transitórias (Cador et al., 1995; Vezina, 2004). Assim, nossos resultados indicam que o uso da racloprida preveniu essas alterações neuroplásticas. No entanto, durante o desafio de Fenciclidina, no qual o animal não recebe racloprida, camundongos RAC-PCP expressaram a sensibilização por Fenciclidina, o que indica que os efeitos residuais de racloprida não foram fortes o suficiente para prevenir totalmente o efeito hiperlocomotor do desafio. Nesse sentido, a fase de expressão da sensibilização reflete alterações neuronais adaptativas persistentes causada pela exposição prévia à Fenciclidina (Cador et al., 1995; Vezina, 2004). Assim, a pré-exposição à racloprida durante a AQ não foi eficiente na prevenção de modificações duradouras dos circuitos neurais, o que pode ser explicado pela hiperatividade funcional que ocorre no sistema mesolímbico do adolescente (Abreu-Villaça et al., 2017). Distintamente, também é possível que as neuroadaptações subjacentes à sensibilização locomotora da Fenciclidina não sejam exclusivamente dependentes da função do receptor D2. A este respeito, estudos anteriores sugerem que, em vez de um aumento da função D2, um desequilíbrio na sinalização mesolímbica de neurônios dopaminérgicos da ATV e seus receptores D1 e D2 de saída no NAcc são relevantes para a sintomatologia positiva da SCHZ (Guillin et al., 2007). Outro fator conhecido que pode influenciar os sintomas positivos de SCHZ é associado ao aumento da transmissão serotoninérgica no cérebro (Giros et al., 1996).

Comparando o primeiro intervalo do desafio com a AQ, observamos que todos os grupos aumentaram sua atividade independente do tratamento prévio. Esse aumento pode ser justificado por um maior interesse dos animais na caixa tendo em vista que eles ficaram 5 dias afastados deste ambiente. Esse interesse foi imediatamente revertido no intervalo 2 como observado com a redução da atividade locomotora. Isso pode ser explicado pela evocação de um tipo de memória que poderia ser comparada a autobiográfica. A suscetibilidade da

consolidação da memória às influências moduladoras que ocorrem após a aprendizagem permite que os processos neurobiológicos ativados pela excitação emocional regulem a força da memória (McGaugh e Gold, 1989). Extensas evidências indicam que os hormônios do estresse liberados pelas glândulas supra-renais, epinefrina e corticosterona (cortisol em humanos) por experiências emocionalmente excitantes desempenham um papel importante na modulação da memória (McGaugh e Roozendaal, 2002). No segundo intervalo do D nenhuma droga foi administrada, podemos observar diferença entre AQ1 e D1 em RAC-PCP e NIC-RAC-PCP não devido a um aumento de atividade no D, mas sim a um efeito hipolocomotor da racloprida em AQ1.

5.3. Nicotina (NIC)

Nossos resultados demonstraram que a exposição a NIC foi capaz de causar uma hiperatividade que foi identificada durante a H e no primeiro intervalo dos dias AQ3, AQ5 e AQ6. Esse efeito pode ser explicado por um efeito ansiolítico da Nicotina que aumentaria a atividade exploratória dos animais no primeiro contato com um ambiente novo (Picciotto et al., 2002; Mayordomo-Cava et al., 2020). Estudos demonstram que a Nicotina pode afetar os níveis de ansiedade de diferentes formas (Picciotto et al., 2002). A exposição à Nicotina aumenta a atividade locomotora e reduz a análise de risco em camundongos adolescentes (Cao et al., 2010; Buck et al., 2019). Se tratando do H1, a hiperatividade locomotora gerada pela Nicotina foi mitigada pela introdução das injeções que causaram um estresse nos intervalos 2º e 3º. Passados 10 min da última injeção, no intervalo 4º, a hiperatividade locomotora retorna. É conhecido o efeito ansiogênico das injeções em modelos animais (Gouveia e Hurst, 2019), o que pode justificar a redução da hiperatividade locomotora gerada pela Nicotina. Além disso, passado a apresentação do ambiente novo no primeiro dia, a exposição à Nicotina não interferiu no processo de habituação ao ambiente, uma vez que tanto os animais NIC, quanto os animais CONT, demonstraram redução da atividade ao longo dos intervalos e ao longo dos dias de H. A redução da atividade locomotora, observada em todos os grupos, intervalos e dias de H é uma tendência natural dos camundongos a reduzir sua atividade exploratória quando expostos repetidamente a um novo ambiente como o CA, caracterizando o fenômeno de habituação (Mayordomo-Cava et al., 2020).

Deve-se notar que o conjunto atual de resultados indica que a Nicotina não acentuou nem atenuou o desenvolvimento de sensibilização locomotora evocada por Fenciclidina. A este respeito, a administração sistêmica de Nicotina durante a adolescência aumenta a relação

de receptores AMPA/NMDA na ATV, o que sugere uma sensibilidade aumentada à plasticidade sináptica induzida pela Nicotina e mediada por receptores NMDA (Placzek et al., 2009). A autoadministração de Nicotina mostrou regular positivamente a expressão de subunidades de receptores NMDA em regiões mesolímbicas, incluindo a ATV (Alasmari et al., 2016). Por sua vez, a administração de antagonistas de receptores NMDA tanto sistemicamente quanto na ATV mostrou inibir a liberação de dopamina evocada por Nicotina no NAcc, possivelmente bloqueando a ativação de receptores NMDA mediada pela Nicotina (Alasmari et al., 2016). Assim, em conjunto, nossos resultados sugerem que, apesar da semelhança ao comparar camundongos PCP e NIC-PCP durante o AQ, na presença de Nicotina, ocorrem relevantes interações bidirecionais entre os sistemas glutamatérgico e colinérgico. Essa conclusão é corroborada pelo efeito inibitório da pré-exposição à Nicotina na expressão da sensibilização locomotora evocada pela Fenciclidina durante o desafio. Na ausência de efeitos estimuladores da Nicotina, o desafio com Fenciclidina por si só foi insuficiente para causar uma resposta hiperlocomotora de longa duração consistente com a expressão de sensibilização no grupo PCP-NIC. Isso indica que os eventos adaptativos que ocorreram durante o período de exposição à Nicotina atenuaram a resposta ao desafio com Fenciclidina, melhorando o comportamento psicótico sensibilizado por Fenciclidina em camundongos adolescentes. Observações semelhantes foram relatadas nas quais a presença de Nicotina durante a adolescência foi associada à remediação de sintomas semelhantes a SCHZ, incluindo comportamentos associados a sintomas positivos dessa doença (Dutra-Tavares et al., 2021).

A Nicotina também acentuou o efeito hipolocomotor da Racloprida no grupo NIC-RAC-PCP em AQ2 e AQ3 no segundo intervalo e em AQ1 AQ2 e AQ3 no terceiro intervalo. Embora os mecanismos responsáveis ainda não estejam esclarecidos, esse resultado aponta para eventos multissinápticos envolvendo os sistemas glutamatérgico, colinérgico e dopaminérgico, e sugere que o bloqueio mediado por Fenciclidina do efeito estimulador da Nicotina em receptores de NMDA, se soma a hipofunção de receptores D2 evocada pela Racloprida. Esses dados sugerem que os receptores D2 são, direta ou indiretamente, afetados pelas ações da Fenciclidina e da Nicotina, levando à atividade locomotora alterada. Após exposições repetidas à Nicotina, ocorre a dessensibilização dos nAChRs. Acredita-se que a Nicotina aumenta a liberação de dopamina no NAcc dessensibilizando nAChRs contendo subunidades $\beta 2$ expressas em terminais dopaminérgicos estriatais (Salminen et al., 2004) e, como resultado, reduzindo o controle inibitório da liberação de dopamina exercida por

interneurônios colinérgicos (Yavas e Young, 2020). A alteração na liberação de dopamina causada pela exposição repetida à Nicotina pode levar a modificações adaptativas na expressão de receptores dopaminérgicos (Di Chiara, 2000). Assim, no grupo NIC-RAC-PCP essa alteração se somaria aos efeitos sobre o sistema dopaminérgico decorrentes do bloqueio dos receptores de NMDA pela Fenciclidina e ao próprio bloqueio causado pela racloprida resultando em uma redução mais acentuada da locomoção. Deve-se notar, no entanto, que o efeito hipolocomotor identificado no NIC-RAC-PCP não foi de longa duração, desaparecendo ao longo do AQ. Esses resultados sugerem que a Nicotina melhora a eficácia terapêutica da medicação nos sintomas psicóticos por meio de mecanismos que convergem no receptor D2. De acordo com esses dados, um estudo recente demonstrou melhora dos sintomas psicóticos mais acentuada em fumantes com SCHZ do que em não fumantes quando em associação com antipsicóticos (Fang et al., 2019). Por outro lado, os dados explicam a falta de desfecho favorável em estudos anteriores em que pacientes adultos estavam sob medicação antipsicótica por longos períodos (Sagud et al., 2019).

Quanto aos resultados da administração de Nicotina no desafio Comparando com AQ1, no terceiro intervalo observamos uma queda em D1 no grupo NIC-PCP isso pode ser explicado pela ausência da Fenciclidina no desafio. Quando comparamos AQ1 com o desafio de NIC-RAC-PCP observamos um aumento no desafio que pode ser explicado pela perda do forte efeito hipolocomotor gerado pela combinação de RAC e NIC na AQ1. Esse efeito observado no intervalo 3 em NIC-RAC-PCP é mantido no intervalo 4.

CONCLUSÃO

Nesse estudo demonstramos que a exposição à Nicotina durante a adolescência não interferiu no desenvolvimento da sensibilização locomotora por Fenciclidina, mas a Nicotina mitigou sua expressão, indicando que a Nicotina não piora e pode até melhorar o comportamento psicótico em modelos de SCHZ por Fenciclidina em camundongos adolescentes. Além disso, o fato de que a Nicotina potencializou os efeitos inibitórios da Racloprida aponta que os receptores D2 desempenham um forte papel nas ações da Fenciclidina e da Nicotina, indicando que esse receptor pode desenvolver um papel central para o desenvolvimento da comorbidade esquizofrenia e dependência ao tabaco durante a adolescência.

REFERÊNCIAS

- ABERG, Karolina A., et al. *A comprehensive family-based replication study of schizophrenia genes*. JAMA psychiatry 70.6 (2013): 573-581.
- ABI-DARGHAM, Anissa; MOORE, Holly. *Prefrontal DA transmission at D1 receptors and the pathology of schizophrenia*. The Neuroscientist 9.5 (2003): 404-416.
- ABREU-VILLAÇA, Yael et al. *Tobacco and alcohol use during adolescence: Interactive mechanisms in animal models*. Biochemical pharmacology vol. 144 (2017): 1-17. doi:10.1016/j.bcp.2017.06.113
- ADRIANI, W et al. *Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice*. Behavioral neuroscience vol. 112,5 (1998): 1152-66. doi:10.1037//0735-7044.112.5.1152
- ADRIANI, W; LAVIOLA, G. *A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice*. Neuropharmacology vol. 39,2 (2000): 334-46. doi:10.1016/s0028-3908(99)00115-x
- ADRIANI, Walter et al. *Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence*. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology vol. 27,2 (2002): 212-24. doi:10.1016/S0893-133X(02)00295-6
- ADRIANI, Walter; LAVIOLA, Giovanni Laviola. "Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice." Behavioral neuroscience vol. 117,4 (2003): 695-703. doi:10.1037/0735-7044.117.4.695
- ALASMARI, Fawaz et al. *Targeting glutamate homeostasis for potential treatment of nicotine dependence*. Brain research bulletin vol. 121 (2016): 1-8. doi:10.1016/j.brainresbull.2015.11.010 Andreasen, N. C.; Olsen, S.; Arch. Gen. Psychiatry 1982, 39, 789.
- BARRETT, Kim E., et al. *Fisiología médica de Ganong*. AMGH Editora, 2014.
- BAXTER, D. N. (1996). *The mortality experience of individuals on the Salford psychiatric case register*. British Journal of Psychiatry, 168, 772–779.
- BAYER, S. A. et al. *Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life*. Science (New York, N.Y.) vol. 216,4548 (1982): 890-2. doi:10.1126/science.7079742
- BENOWITZ, N. L. et al. *Suppression of nicotine intake during ad libitum cigarette smoking by high-dose transdermal nicotine*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics vol. 287,3 (1998): 958-62.
- BENWELL, ME; BALFOUR, DJ (1992). *The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity*. Br J Pharmacol 105:849–856.

BERATIS, S; KATRIVANOU, A; GOURZIS, P. *Factors affecting smoking in schizophrenia*. Comprehensive Psychiatry. 2001;42(5):393-402.

BIANCHI, Serena et al. *Synaptogenesis and development of pyramidal neuron dendritic morphology in the chimpanzee neocortex resembles humans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 110 Suppl 2, Suppl 2 (2013): 10395-401. doi:10.1073/pnas.1301224110

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*. Nature vol. 361,6407 (1993): 31-9. doi:10.1038/361031a0

BOWYER, J. F. et al. *Effects of phencyclidine, amphetamine and related compounds on dopamine release from and uptake into striatal synaptosomes*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics vol. 229,3 (1984): 671-80.

BRESLAU, Naomi; FENN, Nancy; PETERSON, Edward. *Early smoking initiation and nicotine dependence in a cohort of young adults*. Drug and alcohol dependence 33.2 (1993): 129-137.

BRODIE, Mark S. *Low concentrations of nicotine increase the firing rate of neurons of the rat ventral tegmental area in vitro*. Effects of nicotine on biological systems. Birkhäuser Basel, 1991. 373-377.

BROWN, S.; BIRTWISTLE, J.; THOMPSON, C. (1999). *The unhealthy lifestyle of people with schizophrenia*. Psychological Medicine, 29, 697–701.

BUCK, Jordan M., et al. *Developmental nicotine exposure precipitates multigenerational maternal transmission of nicotine preference and ADHD-like behavioral, rhythmometric, neuropharmacological, and epigenetic anomalies in adolescent mice*. Neuropharmacology 149 (2019): 66-82.

CADONI, C.; PISANU, A.; SOLINAS, M.; ACQUAS, E.; DI CHIARA, G. (2001). *Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and crosssensitization with morphine*. Psychopharmacology (Berl) 158:259–266.

CADOR, M.; BJIJOU, Y.; STINUS, L. *Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine*. Neuroscience 65.2 (1995): 385-395.

CALHEIROS, Paulo Renato Vitória; OLIVEIRA, Margareth da Silva; ANDRETTA, Ilana. *Comorbidades psiquiátricas no tabagismo*. Aletheia [online]. 2006, n.23, pp. 65-74. ISSN 1413-0394

CAO, Junran, et al. *Locomotor and stress responses to nicotine differ in adolescent and adult rats*. Pharmacology Biochemistry and Behavior 96.1 (2010): 82-90.

CARLEZON, William A.; WISE, Roy A. *Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex*. Journal of neuroscience 16.9 (1996): 3112-3122.

CELOTTO, Andrea Carla, et al. *Participação dos receptores metabotrópicos de glutamato e da via de sinalização por óxido nítrico no desenvolvimento da esquizofrenia*. Manuscripta Médica 2 (2019): 3-15.

CHAMBERS, R., KRYSTAL, A.; JOHN, H.; SELF, DW. *A Neurobiological Basis for Substance Abuse Comorbidity in Schizophrenia*. Biol Psychiatry. 2001. 15; 50(2): 71–83.

CHAMBERS, Robert. (2009). *A Nicotine Challenge to the Self-Medication Hypothesis in a Neurodevelopmental Animal Model of Schizophrenia*. Journal of dual diagnosis. 5. 139-148. 10.1080/15504260902869808.

ALARCÓN, Charry; TATIANA, Jennifer. *Factores de riesgo psicosociales que influyen en la esquizofrenia en jóvenes de 18 a 26 años: revisión documental*. (2022).

CHEN J., MILLAR W.J.. *Age of smoking initiation: implications for quitting*. Health Reports, 1998; 9:39-46.

CLARKE, P. B. S.; KUMAR, R. *The effects of nicotine on locomotor activity in non- tolerant and tolerant rats*. British journal of pharmacology 78.2 (1983): 329-337.

CUNNINGHAM, CL; NOBLE, D (1992). *Conditioned activation induced by ethanol: role in sensitization and conditioned place preference*. Pharmacol Biochem Behav 43:307–313.

DALACK, G.W.; HEALY, D.; MEADOR-WOODRUFF. J.H. *Nicotine dependence in schizophrenia: clinical phenomena and laboratory findings*. American Journal of Psychiatry, v. 155, n. 11, p. 1490-1501, 1998.

DAVIS, Kenneth L., et al. *Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization*. The American journal of psychiatry (1991).

DE BIASI, Mariella; DANI, John A. *Reward, addiction, withdrawal to nicotine*. Annual review of neuroscience 34 (2011): 105-130.

DE LEON J, Diaz FJ (2005) *A meta-analysis of worldwide studies demonstrates an association between schizophrenia and tobacco smoking behaviors*. Schizophr Res 76:135–157.

DE REZENDE, Vitor Bortolo. *Desenvolvimento de modelos animais alternativos para avaliação dos efeitos comportamentais e metabólicos de antipsicóticos*. (2013).

DI CHIARA, Gaetano; IMPERATO, Assunta. *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats*. Proceedings of the National Academy of Sciences 85.14 (1988): 5274-5278.

DI CHIARA, Gaetano. *Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction*. European journal of pharmacology 393.1-3 (2000): 295-314.

DIAS, Patricia, et al. *Bem-estar, qualidade de vida e esperança em cuidadores familiares de pessoas com esquizofrenia*. Revista Portuguesa de Enfermagem de Saúde Mental 23 (2020): 23-30.

DIEHL, A. et al. Does the degree of smoking effect the severity of tardive dyskinesia? A longitudinal clinical trial. *European Psychiatry*, v. 24, p. 33-40, 2009.

DONG, Yu, et al. *Route of nicotine administration influences in vivo dopamine neuron activity: habituation, needle injection, and cannula infusion*. *Journal of molecular neuroscience* 40.1 (2010): 164-171.

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* vol. 1215 (2008): 40-52. doi:10.1016/j.brainres.2008.03.056

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* vol. 16,9 e0257986. 29 Sep. 2021, doi:10.1371/journal.pone.0257986

ERESHEFSKY L; SAKLAD, SR; WATANABE, MD, et al. *Thiothixene pharmacokinetic interactions: a study of hepatic enzyme inducers, clearance inhibitors, and demographic variables*. *J Clin Psychopharmacol* 1991;11:296–301.

FAHRIZAL, Yanuar; HAMID, Achir Yani Syuhaimie; DAULIMA, Novy Helena Chatarina. *The life during adolescence in the perspective of ex-drug users in Indonesia*. *Enfermeria Clinica* 28 (2018): 316-320.

FANG, Yu et al. *Use of tobacco in schizophrenia: A double-edged sword*. *Brain and behavior* vol. 9,11 (2019): e01433. doi:10.1002/brb3.1433

FARDE, L et al. *Quantitative analysis of D2 dopamine receptor binding in the living human brain by PET*. *Science (New York, N.Y.)* vol. 231,4735 (1986): 258-61. doi:10.1126/science.2867601

FIGLIORE, M; JAHN, C; BAKER, T, et al. *Treating Tobacco Use and Dependence: 2008 Update — Clinical Practice Guideline*.

FOUSSIAS, G., et al. *Prediction of longitudinal functional outcomes in schizophrenia: the impact of baseline motivational deficits*. *Schizophrenia research* 132.1 (2011): 24-27.

FRANKEN, R. A.; MARTINEZ, E. E.; SASSO, S. W. *Histoquímica da fibra muscular cardíaca de ratos jovens e senis sob a influência da nicotina*. *Arq Bras Cardiol* 34 (1980): 289-93.

FREEMAN, Elizabeth, et al. *Sex differences in aripiprazole sensitization from adolescence to adulthood*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 156 (2017): 39-47.

GAO, Jun; QIN, Rongyin; LI, Ming. *Repeated administration of aripiprazole produces a sensitization effect in the suppression of avoidance responding and phencyclidine-induced hyperlocomotion and increases D2 receptor-mediated behavioral function*. *Journal of Psychopharmacology* 29.4 (2015): 390-400.

GARGIULO, PÁ; DE GARGIULO, AI. *Glutamate and modeling of schizophrenia symptoms: review of our findings: 1990-2014*. *Pharmacol Rep*. 2014. 66(3):343-52.

GAULDEN, Andrew D., et al. *Effects of fentanyl on acute locomotor activity, behavioral sensitization, and contextual reward in female and male rats*. Drug and Alcohol Dependence 229 (2021): 109101.

GEORGE, T.P. 2007. *Neurobiological links between nicotine addiction and schizophrenia*. J. Dual Diagn. 3: 27–42.

GILBERT, D.G.; GILBERT, B.O. *Personality, psychopathology and nicotine response as mediators of the genetics of smoking*. Behav Genet 25: 133-47, 1995.

GILBERT, D.G.; MCCLERNON, F.J.; GILBERT, B.O. *The Psychology of the Smoker*. In: BOLLIGER, C. T.; FAGERSTRÖM, KO (eds.): The Tobacco Epidemic. Prog Respir Res 28: 132-50, 1997.

GILMAN, S.; NEWMAN, S. W.; *Manter and Gat's Essential of Clinical Neuroanatomy and Neurophysiology, 9th ed.*, F. A. Davis Company: Philadelphia, 1996.

GIRIRAJAN, Santhosh; EICHLER, Evan E. *Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders*. Human molecular genetics 19.R2 (2010): R176-R187.

GIROS, B.; JABER, M.; JONES, S. et al. *Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter*. Nature 379, 606–612 (1996). <https://doi.org/10.1038/379606a0>

GLASSMAN AH. *Cigarette smoking: implications for psychiatric illness*. Am J Psychiatry 1993;150:546–53.

GLYNN, S.H.; SUSSMAN, S. *Why patients smoke. (Letter)*. Hosp Commun Psychiat 41: 1027, 1990.

GOFF, DC; HENDERSON, DC; AMICO, E. *Cigarette smoking in schizophrenia: relationship to psychopathology and medication side effects*. Am J Psychiatry 1992;149:1189–94.

GOFF, DC; COYLE, JT. *The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia*. Am J Psychiatry. 2001;158(9):1367-77.

GOUVEIA, Kelly; HURST, Jane L. *Improving the practicality of using non-aversive handling methods to reduce background stress and anxiety in laboratory mice*. Scientific reports 9.1 (2019): 1-19.

GREEN, M.A. Tobacco use among individuals with mental illness: nurses' knowledge, confidence, attitudes and practice. 2010. 124 f. Thesis (Master of Nursing)- Faculty of Nursing, University of Manitoba, Winnipeg, 2010.

GUILLIN, Olivier; ABI-DARGHAM, Anissa; LARUELLE, Marc. *Neurobiology of dopamine in schizophrenia*. International review of neurobiology 78 (2007): 1-39.

GRUPTA, Swapnil; KULHARA, Parmananda. *Cellular and molecular mechanisms of drug dependence: An overview and update*. Indian journal of psychiatry 49.2 (2007): 85.

GURILLO, Pedro, et al. *Does tobacco use cause psychosis? Systematic review and meta-analysis*. The Lancet Psychiatry 2.8 (2015): 718-725.

HÄFNER, Heinz. *From onset and prodromal stage to a life-long course of schizophrenia and its symptom dimensions: How sex, age, and other risk factors influence incidence and course of illness*. Psychiatry journal 2019 (2019).

HALL, S.M.; PROCHASKA, JJ. *Treatment of smokers with co-occurring disorders: emphasis on integration in mental health and addiction treatment settings*. Annu Rev Clin Psychol, v.5. p. 409-431, 2009

HAMBSCH, B., et al. *Chronic nicotine improves short-term memory selectively in a G mouse model of schizophrenia*. British journal of pharmacology 171.7 (2014): 1758-1771.

HARDINGHAM, Giles E. *NMDA receptor C-terminal signaling in development, plasticity, and disease*. F1000Research 8 (2019).

HARTZ, SM; PATO, CN; MEDEIROS H; CAVAZOS-REHG, P; SOBELL, JL., KNOWLES, JÁ; BIERUT, LJ; PATO, MT. *Genomic Psychiatry Cohort Consortium (2014) Comorbidity of severe psychotic disorders with measures of substance use*. JAMA Psychiatry 71:248–254.

Hedreen, John C., and Marlon R. DeLong. "Organization of striatopallidal, striatonigral, and nigrostriatal projections in the macaque." Journal of Comparative Neurology 304.4 (1991): 569-595.

HERRÁN, A.; SANTIAGO, A.; SANDOYA, M.; FERNÁNDEZ, M.J.; DÍEZMANRIQUE, J.F.; VÁZQUEZ-BARQUERO, J.L. – Determinants of smoking behaviour in outpatients with schizophrenia. Schizophr Res 41: 373-81, 2000.

HOMAYOUN, Houman, et al. *Functional interaction between NMDA and mGlu5 receptors: effects on working memory, instrumental learning, motor behaviors, and dopamine release*. Neuropsychopharmacology 29.7 (2004): 1259-1269.

HORAN, William P., et al. *Stress and coping responses to a natural disaster in people with schizophrenia*. Psychiatry Research 151.1-2 (2007): 77-86

HOWES, O. D., et al. *Mechanisms underlying psychosis and antipsychotic treatment response in schizophrenia: insights from PET and SPECT imaging*. Current pharmaceutical design 15.22 (2009): 2550-2559.

HUGHES, J.R.; HATSUKAMI, D.K.; MITCHELL, J.E.; DAHLGREN, L.A. *Prevalence of smoking among psychiatric outpatients*. Am J Psychiatry 143: 993-7, 1986.

IKEMOTO S; WISE, RA. *Mapping of chemical trigger zones for reward*. Neuropharmacology. 2004; 1:190-201.

DADOS E NÚMEROS DO TABAGISMO. Inca, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/dados-e-numeros>>. Acesso em: 31/01/2022

PREVENÇÃO DA INICIAÇÃO. Inca, 202a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tabagismo/prevencao-iniciacao#1>. Acesso em: 31/01/2022

JENTSCH, J. David; ROTH, Robert H. *The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia*. Neuropsychopharmacology 20.3 (1999): 201-225.

JOHNSON, J.L. et al. *Gender-specific profiles of tobacco use among non-institutionalized people with serious mental illness*. BMC Psychiatry, v. 10, n. 101, 2010.

JOYCE, EM and IVERSEN, SD (1979). *The effect of morphine applied locally to mesencephalic dopamine cell bodies on spontaneous motor activity in the rat*. Neurosci Lett 14:207–212.

KALIVAS, PW; STEWART, J (1991). *Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity*. Brain Res Rev 16:223–244

KAMIYA, Atsushi, et al. *A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development*. Nature cell biology 7.12 (2005): 1167-1178.

KANDEL, Denise B.; CHEN, Kevin. *Extent of smoking and nicotine dependence in the United States: 1991–1993*. Nicotine & Tobacco Research 2.3 (2000): 263-274.

KAO, Yu-Chen, et al. *Cigarette smoking in outpatients with chronic schizophrenia in Taiwan: relationships to socio-demographic and clinical characteristics*. Psychiatry Research 190.2-3 (2011): 193-199.

KEEFE, Richard SE, et al. *Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial*. Archives of general psychiatry 64.6 (2007): 633-647.

KENNEDY, D. P.; ADOLPHS, R. (2012). *Perception of emotions from facial expressions in high-functioning adults with autism*. Neuropsychologia, 50, 3313–3319.

DAVIS, Kenneth L., et al. *Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization*. The American journal of psychiatry (1991).

KOHLI, Shivali, et al. *Oxytocin attenuates phencyclidine hyperactivity and increases social interaction and nucleus accumbens dopamine release in rats*. Neuropsychopharmacology 44.2 (2019): 295-305.

KOOB, George F. "Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways." Trends in pharmacological sciences 13 (1992): 177-184.

KUDOH, Akira; ISHIHARA, Hironori; MATSUKI, Akitomo. *Current perception thresholds and postoperative pain in schizophrenic patients*. Regional anesthesia and pain medicine 25.5 (2000): 475-479.

KUMARI, V; POSTMA, P. *Nicotine use in schizophrenia: the self medication hypotheses*. *Neurosci Biobehav. Rev.* 2005; 29:1021–1034. [PubMed: 15964073]

KUMRA, Sanjiv, et al. *Efficacy and tolerability of second-generation antipsychotics in children and adolescents with schizophrenia*. *Schizophrenia bulletin* 34.1 (2008): 60-71.

KUSLJIC, Snezana; BUUSE, Maarten van den; GOGOS, Andrea. *Reassessment of amphetamine-and phencyclidine-induced locomotor hyperactivity as a model of psychosis-like behavior in rats*. *Journal of Integrative Neuroscience* 21.1 (2022): 17.

LANG, Undine E et al. *Molecular mechanisms of schizophrenia*. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* vol. 20,6 (2007): 687-702. doi:10.1159/000110430

LAU, Chi-Ieong et al. *Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia?*. *Reviews in the neurosciences* vol. 24,4 (2013): 389-400. doi:10.1515/revneuro-2013-0011

LAWN S.J; POLS, R.G.; BARBER, J.G. *Smoking and quitting: a qualitative study with community-living psychiatric clients*. *Soc Sci Med* 54:93-104, 2002.

LE MOAL, M.; SIMON, H. (1991). *Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles*. *Physiological Reviews*, 71(1), 155– 234. doi:10.1152/physrev.1991.71.1.155

RAMOS, Lima; SCUDELER, Scudeler; DA SILVA, Giovana Mota Marques. *Transtorno Mental E Comportamental No Estado De São Paulo: Variações Da Mortalidade E Morbidade De 2017 A 2020*. *Colloquium Vitae*. Vol. 13. No. 2. 2021.

LIN, Chieh-Hsin; HSIEN-YUAN, Lane; GUOCUAN, E. Tsai. *Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of schizophrenia*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 100.4 (2012): 665-677.

LUBY, Elliot D., et al. *Study of a new schizophrenomimetic drug—Sernyl*. *AMA Archives of Neurology & Psychiatry* 81.3 (1959): 363-369.

LUGER, TM; SULS, J; VANDER WEG; MW (2014). *How robust is the association between smoking and depression in adults? A metaanalysis using linear mixed-effects models*. *Addict Behav* 39:1418–1429.

MALBERGIER, A.; OLIVEIRA Jr., H.P. *Dependência de tabaco e comorbidade psiquiátrica*. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 32, n. 5. p. 276-282, 2005.

MARQUES DE OLIVEIRA, R.; FERREIRA FUREGTO, A. R. *Esquizofrenia Y Dependencia Del Tabaco: Una revisión Integradora*. *Enfermería Global*, vol. 11, n.º 1, enero de 2012, doi:10.6018/eglobal.11.1.143191.

MASSADEH, AM; GHARAIBEH, AA; OMARI, KW. *A Single-Step Extraction Method for the Determination of Nicotine and Cotinine in Jordanian Smokers' Blood and Urine Samples by RP-HPLC and GC-MS*. *J Chromatogr Sci.* 2009;47: 170–177. doi:10.1093/chromsci/47.2.170

MAYORDOMO-CAVA, Jennifer, et al. *Impairments of synaptic plasticity induction threshold and network oscillatory activity in the hippocampus underlie memory deficits in a non-transgenic mouse model of amyloidosis*. Biology 9.7 (2020): 175.

McCLOUGHEN, A. *The association between schizophrenia and cigarette smoking: a review of the literature and implications for mental health nursing practice*. Int J Ment Health Nurs 12(2): 119-29, 2003.

MCGAUGH, James L.; GOLD, Paul E. Gold. *Hormonal modulation of memory*. Psychoendocrinology. Academic Press, 1989. 305-340.

MCGAUGH, James L.; ROOZENDAAL, Benno. *Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain*. Current opinion in neurobiology vol. 12,2 (2002): 205-10. doi:10.1016/s0959-4388(02)00306-9

MERRY S; WERRY, J. *Course and prognosis*. En: Remschmidt H (ed). *Schizophrenia in children and adolescents*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001; pp.268-297.

Mueller, Thomas et al. "The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*." Brain research vol. 1011,2 (2004): 156-69. doi:10.1016/j.brainres.2004.02.073

Auning, E., et al. "Neurobiological correlates of depressive symptoms in people with subjective and mild cognitive impairment." Acta Psychiatrica Scandinavica 131.2 (2015): 139-147.

NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E.; ROBERT, C.M. - *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. New York: Mcgraw-Hill, 2001. 539p. Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? Nat Neurosci. 2005. 8(11):1445-9.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. (2012). *Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 100(4), 656–664. doi:10.1016/j.pbb.2011.08.008

NIDES, Mitchell A., et al. *Predictors of initial smoking cessation and relapse through the first 2 years of the Lung Health Study*. Journal of consulting and clinical psychology 63.1 (1995): 60.

NIKOLAUS, Susanne; ANTKE, Christina; MÜLLER, Hans-Wilhel. *In vivo imaging of synaptic function in the central nervous system: II. Mental and affective disorders*. Behavioural brain research 204.1 (2009): 32-66.

NUECHTERLEIN, Keith H., et al. *Identification of separable cognitive factors in schizophrenia*. Schizophrenia research 72.1 (2004): 29-39.

ÖGREN, Sven Ove, GOLDSTEIN, Menek. *Phencyclidine-and dizocilpine-induced hyperlocomotion are differentially mediated*. Neuropsychopharmacology 11.3 (1994): 167-177.

OHI, Kazutaka, et al. *Smoking rates and number of cigarettes smoked per day in schizophrenia: a large cohort meta-analysis in a Japanese population*. International Journal of Neuropsychopharmacology 22.1 (2019): 19-27.

PAULSON, PE; CAMP, DM; ROBINSON, TE (1991). *Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats*. Psychopharmacology (Berl) 103:480–492.

PAZ, Rodrigo D., et al. *Glutamatergic dysfunction in schizophrenia: from basic neuroscience to clinical psychopharmacology*. European Neuropsychopharmacology 18.11 (2008): 773-786.

URRUTIA-PEREIRA, Marilyn; CHONG-NETO, Herberto José; SOLÉ, Dirceu. *Controle de tabagismo em jovens e adultos: o Brasil fez sua lição de casa?*. Jornal Brasileiro de Pneumologia 47 (2021).

PICCIOTTO, MR; BRUNZELL, DH; CALDARONE, BJ. *Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression*. Neuroreport 2002;13:1097–106.

PIERCE, JP, GILPIN, E (1996). *How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes?* Am. J. Pub. Health 86: 253-256.

PIERCE, R. Christopher; KALIVAS, Peter W. *A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants*. Brain research reviews 25.2 (1997): 192-216.

PITTA, J. C. N. (2019). *Caso Complexo: Amélia. Especialização em Saúde da família*. Universidade Aberta do SUS. Disponível em: <https://www.unasus.unifesp.br/biblioteca_virtual/pab/4/unidades_casos_complexos/unidade27/unidade27_ft_esquizofrenia.pdf>. Acesso em: 31/01/2022.

PLACZEK, Andon Nicholas; ZHANG, Tao A.; DANI, John Anthony. *Nicotinic mechanisms influencing synaptic plasticity in the hippocampus*. Acta Pharmacologica Sinica 30.6 (2009): 752-760.

POMERLEAU, OF; POMERLEAU, CS. *Cortisol response to a psychological stressor and/or nicotine*. Pharmacol Biochem Behav 1990;36:211–3.

POST, RM; WEISS, SR; PERT, A (1992). *Sensitization and kindling effects of chronic cocaine administration, in Cocaine: Pharmacology, Physiology and Clinical Strategies* (Lakoski JM, Galloway MP, and White FJ eds) pp 115–161, CRC Press, Ann Arbor, MI.

QIAO, Jing, et al. *Long-lasting sensitization induced by repeated risperidone treatment in adolescent Sprague-Dawley rats: a possible D2 receptor mediated phenomenon?* Psychopharmacology 231.8 (2014): 1649-1659.

RAPOPORT, JL, ADDINGTON, AM, FRANGO, S, PSYCH, MR. *The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005*. Mol Psychiatry. 200510(5):434-49.

RATTO, Lilian R C et al. *Prevalence of tobacco use in individuals with severe mental illnesses*, São Paulo, Brazil. *Revista de saude publica* vol. 41,4 (2007): 510-6. doi:10.1590/s0034-89102006005000039

REITSMA, Marissa B., et al. *Spatial, temporal, and demographic patterns in prevalence of smoking tobacco use and attributable disease burden in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019*. *The Lancet* 397.10292 (2021): 2337-2360.

RESENDE, Ana Cristina; VIGLIONE Donald J.; II DE L., Argimon. *Gender differences in schizophrenia through Rorschach technique*. *Psico* 40.3 (2009): 279-286.

RIAL, K; HAKKO, H; ISOHANNI, M. et al. *Is initiation of smoking associated with the prodromal phase of schizophrenia?* *Rev Psychiatr Neuroscience*. 2005;30(1):26-32.

RIPKE, Stephan, et al. *Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci*. *Nature* 511.7510 (2014): 421.

ROBINSON, Terry E.; BECKER, Jill B. *Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis*. *Brain research reviews* 11.2 (1986): 157-198.

ROBINSON, TE; BERRIDGE, KC (1993) *The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction*. *Brain Res Rev* 18:247–291

ROBINSON, TE; BERRIDGE, KC (2001) *Incentive-sensitization and addiction*. *Addiction* 96:103–114

RODGERS, R. J., et al. *Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 52.4 (1995): 805-813.

ROSEMBERG, J. *Nicotina 1 vol Ed Colégio Médico del Peru*. Comisión de Lucha Antitabáquica. COLAT. Peru (1999).

ŠAGUD, Marina, et al. *Smoking and schizophrenia*. *Psychiatria Danubina* 21.3 (2009): 371-375.

SALMINEN, Outi, et al. *Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice*. *Molecular pharmacology* 65.6 (2004): 1526-1535.

SAMS-DODD, F. *Effect of novel antipsychotic drugs on phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in the rat social interaction test*. *Behavioural pharmacology* vol. 8,2-3 (1997): 196-215.

SHANKAR, J. Chinta; ANDERSEN, Julie K. *Dopaminergic neurons*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 37, Issue 5, 2005, Pages 942-946, ISSN 1357-2725, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>.

SLIFSTEIN, M et al. *COMT genotype predicts cortical-limbic D1 receptor availability measured with [11C]NNC112 and PET*. *Molecular psychiatry* vol. 13,8 (2008): 821-7. doi:10.1038/mp.2008.19

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, WG. *Statistical Methods*. 6th ed. Ames: University Press; 1967.

SPEAR, L. *Modeling adolescent development and alcohol use in animals*. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* vol. 24,2 (2000): 115-23.

SPEAR, Linda Patia. *The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol*. *Journal of studies on alcohol. Supplement* ,14 (2002): 71-81. doi:10.15288/jsas.2002.s14.71

SPEAR, Linda Patia. *Adolescent neurodevelopment*. *Journal of adolescent health* 52.2 (2013): S7-S13.

STEKETEE, Jeffery D.; KALIVAS, Peter W. *Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior*. *Pharmacological reviews* 63.2 (2011): 348-365.

STELLMAN, Steven D.; DJORDJEVIC, Mirjana V. *Monitoring the tobacco use epidemic II: The agent: Current and emerging tobacco products*. *Preventive medicine* 48.1 (2009): S11-S15.

SWERDLOW, NR; BRAFF, DL; TAAID, N; GEYER, MA. *Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients*. *Arch Gen Psychiatry*. 1994;51(2):139-54.

TAIOLI, Emanuela; WYNDER, Ernst L. *Effect of the age at which smoking begins on frequency of smoking in adulthood*. *The New England Journal of Medicine* 325.13 (1991): 968-969.

TAJIMA-POZO, Kazuhiro, et al. *Understanding the direct and indirect costs of patients with schizophrenia*. *F1000Research* 4 (2015).

VAN OS, Jim; KAPUR, Shitij Kapur. *Schizophrenia*. *Lancet* (London, England) vol. 374,9690 (2009): 635-45. doi:10.1016/S0140-6736(09)60995-8

VANDERSCHUREN, Louk JMJ; KALIVAS, Peter W. *Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies*. *Psychopharmacology* 151.2 (2000): 99-120.

VEZINA, Paul. *Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27.8 (2004): 827-839.

VOLF, Nick; HU, Gang; LI, Ming. *Iptakalim preferentially decreases nicotine-induced hyperlocomotion in phencyclidine-sensitized rats: a potential dual action against nicotine addiction and psychosis*. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* 10.3 (2012): 168.

WANG, X; LIU, J; DAI, Z; SUI, Y. *Andrographolide improves PCP-induced schizophrenia-like behaviors through blocking interaction between NRF2 and KEAP1*. J Pharmacol Sci. 2021 Sep;147(1):9-17. doi: 10.1016/j.jphs.2021.05.007. Epub 2021 May 24. PMID: 34294378.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *The health of youth*. 1989. Geneva, 1989 (document A42/Technical Discussions/2).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000–2025, third edition*. Geneva, 2019 <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330221/9789240000032-eng.pdf?ua=1> (2019, accessed 14 February 2022).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Tobacco*. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>. Access in: 01. Maio. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2021). *International Classification of Diseases 11th Revision*. The global standard for diagnostic health information. Available at: <https://icd.who.int/en> Access in: 13 abril. 2022.

WILLS, Lauren, et al. *Neurobiological mechanisms of nicotine reward and aversion*. Pharmacological Reviews 74.1 (2022): 271-310.

WOOD, T; ELLEN WEWERS, M; GRONER, J; AHIJEVYCH, K. *Smoke constituent exposure and smoking topography of adolescent daily cigarette smokers*. Nicotine Tob Res. 2004;6: 853–862. doi:10.1080/1462220042000282537

YAVAS, Ersin; MJ YOUNG, Andrew. *Repeated phencyclidine disrupts nicotinic acetylcholine regulation of dopamine release in nucleus accumbens: Implications for models of schizophrenia*. Neurochemistry International 140 (2020): 104836.

YILMAZ, Melis et al. *Overexpression of schizophrenia susceptibility factor human complement C4A promotes excessive synaptic loss and behavioral changes in mice*. Nature neuroscience vol. 24,2 (2021): 214-224. doi:10.1038/s41593-020-00763-8.

ZHANG, XY, et al. *Smoking initiation and schizophrenia: a replication study in a Chinese Han population*. Schizophrenia Research. 2010;119:110-14.

ZIEDONIS, DM; KOSTEN, TR, GLAZER, WM. et al. *Nicotine dependence and schizophrenia*. Hosp Community Psychiatry 1994;45:204–6.

ANEXO – Artigo de referência

Neuropharmacology

Adolescent nicotine potentiates the inhibitory effect of raclopride, a D2R antagonist, on phencyclidine-sensitized psychotic-like behavior in mice

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Psychosis; Positive Symptoms; Tobacco; Prodrome, Adolescence
Corresponding Author:	Yael Abreu-Villaça, PhD Universidade do Estado do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
First Author:	Yael Abreu-Villaça, PhD
Order of Authors:	Yael Abreu-Villaça, PhD Ana Carolina Dutra-Tavares, Ph.D Anais Bandeira-Martins, M.Sc. Juliana O. Silva, Ph.D Luciana A. Couto, M.Sc. Claudio C. Filgueiras, Ph.D Anderson Ribeiro-Carvalho, Ph.D Alex C. Manhães, Ph.D
Abstract:	The association between schizophrenia and nicotine addiction becomes evident during adolescence. Here, to investigate interactive events that might underlie the early establishment of this comorbidity, we used phencyclidine-evoked locomotor sensitization, a proxy model of psychotic behavior, and nicotine minipump infusions in adolescent mice. Considering the involvement of dopamine D₂ receptors in both schizophrenia and addiction, we further tested their role by exposing mice to raclopride. Adolescent mice that were either exposed to nicotine (24mg/Kg/day) or not, received single daily raclopride (0.5mg/kg, s.c.) or saline followed by phencyclidine injections (10mg/Kg, s.c.). Drugs administration was followed by open field testing for 6 days (acquisition period, ACQ). Phencyclidine and nicotine challenges (sensitization test, ST) were carried out after a 5-day withdrawal. Ambulation escalated in response to repeated phencyclidine exposure during ACQ and was increased after phencyclidine challenge, evidencing development and expression of locomotor sensitization. Raclopride prevented phencyclidine-evoked development of sensitization. However, raclopride pre-exposure during ACQ only shortened its expression in phencyclidine-challenged mice. Nicotine failed to interfere with phencyclidine stimulatory effects during ACQ but potentiated raclopride inhibition during the first ACQ days. During ST, nicotine history shortened the expression of phencyclidine-evoked sensitization. Nicotine challenge had no impact on locomotion, which is consistent with a lack of nicotine/phencyclidine cross-sensitization. In conclusion, our results show that nicotine does not worsen, and may even ameliorate phencyclidine-sensitized psychotic-like behavior in adolescent mice. The potentiation of raclopride-mediated inhibition further suggests that nicotine transiently improves the therapeutic efficacy of medication on psychotic symptoms through mechanisms that converge on D₂ receptors.
Suggested Reviewers:	Marinete P Carrera, Ph.D Professor, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro marinete@uenf.br Dr. Carrera works with behavioral analysis. One of her expertise is behavioral sensitization evoked by psychoactive drugs.

	Yousef Tizabi, Ph.D Professor, Howard University ytizabi@Howard.edu Dr. Tizabi's group investigates the effects of nicotine, ethanol and nicotine+ethanol
	exposures on the central nervous system of experimental animals
	Tania Marcourakis, Ph.D Professor, Universidade de São Paulo: Universidade de Sao Paulo tmarcour@usp.br Dr. Marcourakis works in the area of Toxicology, with emphasis on neurotoxicity of nicotine and cigarette smoke.
	Gilda A Neves, Ph.D Associate Professor, Universidade Federal do Rio de Janeiro ganeves@icb.ufrj.br Dr. Neves has been working with mechanisms that underlie schizophrenia and with the investigation of alternative/complimentary treatments for this mental disorder.
	Joseph R DiFranza, M.D, Ph.D Professor, University of Massachusetts Medical School difranzj@ummc.org Dr. DiFranza's work in adolescent smokers in several aspects parallels our research on the effects of nicotine exposure in animal models of developmental exposure
	Theodore Slotkin, Ph.D Professor, Duke University t.slotkin@duke.edu Dr. Slotkin has been working on the mechanisms of action and effects of nicotine exposure during development for 4 decades. More recently, he developed studies on the effects of tobacco smoke in rats and monkeys. He also investigates the effects of interactions between drugs on the nervous system.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE NEUROFISIOLOGIA

Editor, **Neuropharmacology**

Rio de Janeiro, May 16th, 2022.

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled “**Adolescent nicotine potentiates the inhibitory effect of raclopride, a D2R antagonist, on phencyclidine-sensitized psychotic-like behavior in mice**” to be considered for publication as a research article in **Neuropharmacology**. We would like to stress that this manuscript, or parts of it, have not been, and will not be submitted elsewhere for publication.

All authors listed below significantly contributed to the manuscript, had access to all relevant data as well as have revised the manuscript and agree that the work is ready for submission to a journal. All authors accept responsibility for the manuscript's contents. None of the authors have any conflict of interest regarding the submitted article.

We have read and have abided by the statement of ethical standards for manuscripts submitted to Neuropharmacology.

Thank you in advance for your attention,

Prof. Yael Abreu-Villaça
Laboratório de Neurofisiologia
Departamento de Ciências Fisiológicas
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Avenida Professor Manuel de Abreu, 444, 5 andar, Sala 10
Rio de Janeiro, RJ, 20550-170 Brazil
Phone: (55-21) 2868-8195 / Fax: (55-21) 2868-8029
E-mail: yael_a_v@yahoo.com.br
yael_a_v@pq.cnpq.br

Authors' list

- Ana Carolina Dutra-Tavares - dutratavaresana@gmail.com
- Anais Bandeira-Martins - anais-band@hotmail.com
- Juliana O. Silva - o.silvajuliana@yahoo.com.br
- Luciana Araujo Couto - lucoutoanato@gmail.com
- Claudio C. Filgueiras - ccfilg@yahoo.com.br

- Anderson Ribeiro-Carvalho - ribeiro_carvalho@yahoo.com.br
- Alex C. Manhães – ac_manhaes@yahoo.com.br

- Yael Abreu-Villaça - rael_a_v@yahoo.com.br, rael_a_v@pq.cnpq.br

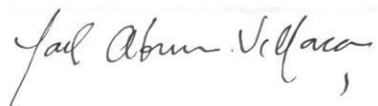
Declaration of interests

☒ The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☐ The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

N/A

Thank you in advance for your attention,



Prof. Yael Abreu-Villaça
 Laboratório de Neurofisiologia
 Departamento de Ciências Fisiológicas
 Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
 Universidade do Estado do Rio de Janeiro
 Avenida Professor Manuel de Abreu, 444, 5 andar, Sala 10
 Rio de Janeiro, RJ, 20550-170 Brazil
 Phone: (55-21) 2868-8195 / Fax: (55-21) 2868-8029
 E-mail: yael_a_v@yahoo.com.br
yael_a_v@pq.cnpq.br

HIGHLIGHTS

- Adolescent phencyclidine evokes locomotor sensitization development and expression.
- Adolescent nicotine does not worsen psychotic-like behavior.
- Adolescent nicotine potentiates the inhibitory effect of D₂R antagonism.
- Phencyclidine and nicotine actions during adolescence converge on D₂R.
- There is no nicotine/phencyclidine cross-sensitization during adolescence.

Adolescent nicotine potentiates the inhibitory effect of raclopride, a D₂R antagonist, on phencyclidine-sensitized psychotic-like behavior in mice

Ana Carolina Dutra-Tavares^{1¶}, Anaís Bandeira-Martins^{1¶}, Juliana O. Silva¹, Luciana A. Couto¹, Claudio C. Filgueiras¹, Anderson Ribeiro-Carvalho², Alex C. Manhães¹, Yael Abreu-Villaça^{1*}

1. Laboratório de Neurofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
2. Departamento de Ciências, Faculdade de Formação de Professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, São Gonçalo, RJ, Brazil.

Corresponding author: Dr. Yael Abreu-Villaça (YAV)
E-mail: yael_a_v@yahoo.com.br
yael_a_v@pq.cnpq.br
ORCID: 0000-0002-9801-6179

Short title: Nicotine, schizophrenia and D₂ receptors.

Co-authors:

Ana Carolina Dutra-Tavares
dutratavaresana@gmail.com
ORCID: 0000-0001-9436-2712

Alex Christian Manhães
ac_manhaes@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0003-4629-8343

Anaís Bandeira-Martins
Anaís-band@hotmail.com
ORCID: 0000-0003-1315-5450

Juliana Oliveira-Silva
o.silvajuliana@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0002-4189-2899

Luciana Araujo Couto
lucoutoanato@gmail.com
ORCID: 0000-0003-3831-0226

Claudio C. Filgueiras
ccfilg@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0003-4522-4799

Anderson Ribeiro-Carvalho
ribeiro_carvalho@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0003-4324-1413

¶ These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

The association between schizophrenia and nicotine addiction becomes evident during adolescence. Here, to investigate interactive events that might underlie the early establishment of this comorbidity, we used phencyclidine-evoked locomotor sensitization, a proxy model of psychotic behavior, and nicotine minipump infusions in adolescent mice. Considering the involvement of dopamine D₂ receptors in both schizophrenia and addiction, we further tested their role by exposing mice to raclopride. Adolescent mice that were either exposed to nicotine (24mg/Kg/day) or not, received single daily raclopride (0.5mg/kg, s.c.) or saline followed by phencyclidine injections (10mg/Kg, s.c.). Drugs administration was followed by open field testing for 6 days (acquisition period, ACQ). Phencyclidine and nicotine challenges (sensitization test, ST) were carried out after a 5-day withdrawal. Ambulation escalated in response to repeated phencyclidine exposure during ACQ and was increased after phencyclidine challenge, evidencing development and expression of locomotor sensitization. Raclopride prevented phencyclidine-evoked development of sensitization. However, raclopride pre-exposure during ACQ only shortened its expression in phencyclidine-challenged mice. Nicotine failed to interfere with phencyclidine stimulatory effects during ACQ but potentiated raclopride inhibition during the first ACQ days. During ST, nicotine history shortened the expression of phencyclidine-evoked sensitization. Nicotine challenge had no impact on locomotion, which is consistent with a lack of nicotine/phencyclidine cross-sensitization. In conclusion, our results show that nicotine does not worsen, and may even ameliorate phencyclidine-sensitized psychotic-like behavior in adolescent mice. The potentiation of raclopride-mediated inhibition further suggests that nicotine transiently improves the therapeutic efficacy of medication on psychotic symptoms through mechanisms that converge on D₂ receptors.

Keywords: Psychosis; Positive Symptoms; Tobacco; Prodrome, Adolescence.

Adolescent nicotine potentiates the inhibitory effect of raclopride, a D₂R antagonist, on phencyclidine-sensitized psychotic-like behavior in mice

Ana Carolina Dutra-Tavares^{1¶}, Anais Bandeira-Martins^{1¶}, Juliana O. Silva¹, Luciana A. Couto¹, Claudio C. Filgueiras¹, Anderson Ribeiro-Carvalho², Alex C. Manhães¹, Yael Abreu-Villaça^{1*}

1. Laboratório de Neurofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
2. Departamento de Ciências, Faculdade de Formação de Professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, São Gonçalo, RJ, Brazil.

Corresponding author: Dr. Yael Abreu-Villaça (YA-V)
E-mail: yael_a_v@yahoo.com.br
yael_a_v@pq.cnpq.br
ORCID: 0000-0002-9801-6179

Short title: Nicotine, schizophrenia and D₂ receptors.

Co-authors:

Ana Carolina Dutra-Tavares	Alex Christian Manhães
dutratavaresana@gmail.com	ac_manhaes@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0001-9436-2712	ORCID: 0000-0003-4629-8343

Anais Bandeira-Martins	Juliana Oliveira-Silva
Anais-band@hotmail.com	o.silvajuliana@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0003-1315-5450	ORCID: 0000-0002-4189-2899

Luciana Araujo Couto	Claudio C. Filgueiras
lucoutoanato@gmail.com	ccfilg@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0003-3831-0226	ORCID: 0000-0003-4522-4799

Anderson Ribeiro-Carvalho
ribeiro_carvalho@yahoo.com.br
ORCID: 0000-0003-4324-1413

¶ These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

The association between schizophrenia and nicotine addiction becomes evident during adolescence. Here, to investigate interactive events that might underlie the early establishment of this comorbidity, we used phencyclidine-evoked locomotor sensitization, a proxy model of psychotic behavior, and nicotine minipump infusions in adolescent mice. Considering the involvement of dopamine D₂ receptors in both schizophrenia and addiction, we further tested their role by exposing mice to raclopride. Adolescent mice that were either exposed to nicotine (24mg/Kg/day) or not, received single daily raclopride (0.5mg/kg, s.c.) or saline followed by phencyclidine injections (10mg/Kg, s.c.). Drugs administration was followed by open field testing for 6 days (acquisition period, ACQ). Phencyclidine and nicotine challenges (sensitization test, ST) were carried out after a 5-day withdrawal. Ambulation escalated in response to repeated phencyclidine exposure during ACQ and was increased after phencyclidine challenge, evidencing development and expression of locomotor sensitization. Raclopride prevented phencyclidine-evoked development of sensitization. However, raclopride pre-exposure during ACQ only shortened its expression in phencyclidine-challenged mice. Nicotine failed to interfere with phencyclidine stimulatory effects during ACQ but potentiated raclopride inhibition during the first ACQ days. During ST, nicotine history shortened the expression of phencyclidine-evoked sensitization. Nicotine challenge had no impact on locomotion, which is consistent with a lack of nicotine/phencyclidine cross-sensitization. In conclusion, our results show that nicotine does not worsen, and may even ameliorate phencyclidine-sensitized psychotic-like behavior in adolescent mice. The potentiation of raclopride-mediated inhibition further suggests that nicotine transiently improves the therapeutic efficacy of medication on psychotic symptoms through mechanisms that converge on D₂ receptors.

Keywords: Psychosis; Positive Symptoms; Tobacco; Prodrome, Adolescence.

1. INTRODUCTION

Schizophrenia (SCHZ) is a neuropsychiatric disorder that affects approximately 0.9% of the general population (Perälä et al., 2007) and causes life-long suffering and disability (van Os and Kapur, 2009). SCHZ is highly co-morbid with nicotine addiction. Smoking lifetime prevalence in SCHZ is 50-90%, being 2-4× higher than prevalence numbers in the general population (Kumari and Postma, 2005; Ohi et al., 2019). SCHZ patients smoke higher number of cigarettes, inhale deeper and for longer duration and perceive a heightened reinforcement value in smoking when compared to nonpsychiatric smokers (Spring et al., 2003; Ziedonis et al., 2008).

This co-morbidity begins early. The prodromal stage of SCHZ has its onset still during adolescence, when the first symptoms appear and progressively aggravate (Häfner, 2019; Miller et al., 2003; Tandon et al., 2009). Similarly, the first use and progress to misuse of combustible tobacco products typically occur during adolescence (Lanza and Vasilenko, 2015), which has also shown to be true for electronic nicotine delivery systems (ENDS) (Cullen et al., 2019, 2018; Miech et al., 2019). These data are consistent with evidence that there is already prevalence of 17-46% of tobacco use in the prodromal phase (Gogos et al., 2019) and a 59-78% prevalence and odds of 6 for tobacco consumption in patients with first-episode psychosis compared with matched controls (Lally et al., 2019; Myles et al., 2012). While these data corroborate that adolescence is a period of susceptibility to both nicotine misuse and SCHZ, the mechanisms that underlie the establishment of this co-morbidity are yet to be clarified, which poses a great need for studies that investigate the interactions between these conditions during this period of development.

Positive symptoms represent a core feature of SCHZ and include hallucinations and delusions. They are relevant contributors to the stigmatization of SCHZ patients, which has a severe impact on the onset and poor clinical course of the disease (van Zelst, 2009). The positive symptomatology of SCHZ is associated with the hyperactivity of the mesolimbic dopaminergic pathway (Abi-Dargham et al., 1998; Fusar-Poli and Meyer-Lindenberg, 2013; Lau et al., 2013), with an established prominent role for D₂ receptors (D₂R) in its etiology (Guillin et al., 2007; Seeman, 2011). The mesolimbic hyperactivity, in turn, may be mediated by the disbalance of the glutamatergic system described to occur both in SCHZ patients (Goff and Coyle, 2001; Javitt et al., 2012; Lin et al., 2012) and in animal models of this disorder (Carlezon and Wise, 1996; Hernandez et al., 1988; Kohli et al.,

2019). Regarding nicotine, it acts through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) present in dopaminergic neurons and in terminals of glutamatergic ones stimulating the ventral tegmental area (Abreu-Villaça et al., 2017; Wills et al., 2022), which results in increased dopamine (DA) release in the nucleus accumbens (NAcc) that is, in part, mediated by D₂R (Sziráki et al., 2002). This raises the possibility of a nicotine-mediated potentiation of positive symptoms in SCHZ patients that smoke. Despite that, while there is evidence that nicotine is a psychosis-generating drug (Ding and Hu, 2021), some studies demonstrate that it does not worsen the positive symptoms of SCHZ (Danielsson et al., 2021). In this regard, functional interactions between nAChRs and D₂ autoreceptors in the modulation of DA release in the NAcc might play a role (Grilli et al., 2009; Quarta et al., 2007). Alternatively, impairment in glutamatergic neurotransmission may impact nicotine-mediated effects on glutamatergic neurons (Alasmari et al., 2016).

Despite the evidence of multi-synaptic events involving the glutamatergic, cholinergic and dopaminergic systems in the positive symptomatology of SCHZ, and in the effects of nicotine in the mesolimbic system, few studies have combined a glutamatergic disbalance model of SCHZ with an animal model of nicotine exposure to investigate interactive events between these neurotransmitter systems. Also, we are unaware of studies in adolescent models. This is particularly relevant due to evidence of continuing neurobiological maturation events such as a gradual shift in NMDA receptor subunit composition from a predominant GluN2B-containing to ‘mature’ NMDA receptors containing GluN2A (Wyllie et al., 2013), a peak of nAChRs in several brain regions including the ventral tegmental area and NAcc (Doura et al., 2008; Renda et al., 2016), and an increased expression of dopaminergic receptors and basal DA levels in the NAcc (Abreu-Villaça et al., 2017), that take place during adolescence and that may interfere with the previously described early association between nicotine misuse and SCHZ.

In order to test the hypothesis that nicotine interferes with positive symptoms of schizophrenia, we assessed locomotor sensitization in an adolescent mouse model of phencyclidine-induced psychosis and combined nicotine exposure. In addition, we tested the involvement of D₂R on phencyclidine and nicotine interactive effects by administering the typical antipsychotic drug raclopride, a D₂R antagonist with relatively high selectivity (Roth et al., 1994; Strange, 2001), to mice exposed to nicotine and modeled to SCHZ.

The behavioral phenotype of hyperlocomotor activity, when combined with a progressive increase in activity, characterizes locomotor sensitization and is a well-known model of behavioral plasticity associated with the positive symptoms of SCHZ (Richtand

et al., 2001; Sams-Dodd, 1998). Evidence that locomotor sensitization reflects neuroadaptations in the mesolimbic system further suggests shared molecular and neural bases between locomotor sensitization and both SCHZ and addiction processes (Cador et al., 1995; Pierce and Kalivas, 1995; Vezina, 2004). Phencyclidine, a non-competitive NMDA receptor (NMDAR) antagonist and a validated and widely used SCHZ animal model, was chosen due to evidence that, when repeatedly administered to rodents, it induces locomotor sensitization and a progressive amplification of DA release in the mesolimbic system (Bubeníková-Valešová et al., 2008; Jones et al., 2011; Winship et al., 2018), characterizing a psychosis-like state. In healthy human subjects, phencyclidine abuse typically triggers a mental disorder that strongly resembles acute schizophreniform psychosis, while in SCHZ patients, this drug worsens SCHZ symptoms (Jones et al., 2011; Large, 2007). Regarding nicotine, subcutaneous osmotic minipumps has been used as a surrogate for tobacco smoking. This model allows for a constant dose and a controlled period of administration (Hambesch et al., 2014; Nunes-Freitas et al., 2011).

2. METHODS

2.1. Materials

Nicotine *free base* and raclopride tartrate were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Phencyclidine was purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Ketamine (CEVA, Brazil), xylazine (Syntec, Brazil), flunixin (UCB/VET, Brazil) and enrofloxacin (VENCO, Brazil) were specific for veterinary use. VETEC Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was the source for all other reagents.

2.2. Subjects

All experimental procedures were approved by the Institute of Biology/UERJ Ethical Committee for Animal Research (protocol#: CEUA/033/2018), minimizing the number of animals used and avoiding animal suffering, in accordance with Brazilian Law # 11.794/2008 and with the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). All mice were kept in our animal facility housed in groups of 2-5 at 21-22°C on a 12-h light/dark cycle (lights on at 1:00 a.m.). Access to food and filtered water was *ad libitum*. Animals were derived from a

C57BL/6 colony maintained at the Universidade Federal Fluminense (Niteroi, Brazil) for over 60 generations.

2.3. Experimental Protocol (Fig. 1)

From postnatal (PN) 37 to PN50, mice were exposed to nicotine. Briefly, at PN37, mice were anesthetized with xylazine (20 mg/Kg, i.p) and ketamine (100 mg/Kg, i.p), a small area on the back was shaved, and an incision was made to permit s.c. insertion of an osmotic minipump (model 1002, diffusion rate: 0.25 μ L/h, Alzet, Cupertino, CA, USA). Minipumps were prepared on the day preceding implantation with nicotine free base diluted in milli-Q water (pH adjusted to 6.0 with 5M NaOH) so as to deliver an initial dose rate of 24 mg/Kg/day of nicotine (NIC group). Incisions were closed after minipump insertion and, both right after closure and on the following day, mice were given flunixin (2.5 mg/Kg, s.c. 2.5 mL/Kg body mass) and enrofloxacin (2.5 mg/Kg, s.c. 2.5 mL/Kg body mass) for pain management and infection prevention. The period of exposure to nicotine intended to parallel human exposure during adolescence, a key period for initiation of tobacco and ENDS consumption (Cullen et al., 2019, 2018; Singh et al., 2016). The dose rate used in the current study was chosen based on a previous study that, by exposing mice to the same dose, produced nicotine serum levels (Hambusch et al., 2014) that are within the range of those found in smokers (Massadeh et al., 2009; Wood et al., 2004). Control mice were implanted with minipumps containing milli-Q water (CT group). Animals were allowed to recover from surgery in their home cages, being monitored twice a day for two days for fur appearance and behavior. There was no evidence of suffering and there were no deaths during postoperative period.

From PN42 to PN56, mice were submitted to a sensitization protocol in an open field arena. Briefly, the open field arena (Insight, SP, Brazil) consists of a transparent acrylic box (46 cm length $\times$ 46 cm width $\times$ 43 cm height) that is equipped with 2 arrays of 16 infrared beams each, positioned at 1.5 cm above the floor, to measure horizontal spontaneous locomotor activity. Mice are individually placed in the center of the arena in the beginning of each session. Interruptions of photocell beams are detected by a computer system and the location of the animal is calculated by the software with a 0.1-s resolution. Spontaneous locomotor activity (Ambulation) was determined on the basis of the traversed distance. All sessions were performed during the photoperiod, between 8 a.m. and 12 p.m., in a sound attenuated room and with lights on (40 W fluorescent light bulb, 3 m high). There were 4 open field arenas and a maximum of 12 mice were tested each day. The

animals were allowed to acclimatize to the test room for at least 10 min before each session. Each session lasted 60 min. For the analysis, each session was divided into 3 intervals of 10 min and a fourth interval expressed as the mean locomotor value of the last 30 min of the test. The test apparatuses were cleaned with paper towels soaked in 35% ethanol and dried before each test.

The sensitization protocol consists of 4 phases (Fig. 1): Habituation, Acquisition (pharmacological treatment), Withdrawal and Sensitization Test (drug challenge). In the Habituation (HAB) phase, animals were handled by the experimenter and habituated to the injection cycles and open field tests that occurred throughout the experiment. Initially, mice were allowed to explore the open field arena for 10 min. Mice then received a subcutaneous (s.c.) injection of a saline solution (NaCl 0.9%) and were placed back in the arena for 10 min. Lastly, mice received a second injection (NaCl 0.9%, s.c.) and were again allowed to explore the arena for additional 40 min. These procedures were repeated once daily for 3 consecutive days (PN42-44, from now on referred to as HAB1 to 3). Accordingly, in the HAB phase, there were 2 experimental groups: CT (♀ = 26, ♂ = 24) and NIC (♀ = 24, ♂ = 24). The 3 HAB sessions (days), and corresponding subdivisions (intervals), allowed separate analyses of day-to-day and interval-to-interval alterations in ambulation as a result of nicotine exposure, analyses of the impact of repeated testing and of the stress associated to the injections.

The Acquisition (ACQ) phase began on the day immediately after HAB3 and lasted 6 days (PN45-50). On each ACQ day, after 10 min in the open field, mice were exposed to raclopride (0.5 mg/Kg, s.c. dissolved in saline and administered at a volume of 2.5 mL/Kg body mass) or saline, and were placed back in the arena for 10 min. This period was followed by a phencyclidine injection (10 mg/Kg, s.c., dissolved in saline and administered at a volume of 2.5 mL/Kg body mass) (Beraki et al., 2009; Engel et al., 2015) that was immediately followed by a 40-min period of exploration. Accordingly, during ACQ, there were 4 groups: PCP (phencyclidine-exposed, ♀ = 14, ♂ = 12); NIC-PCP (nicotine and phencyclidine-exposed, ♀ = 12, ♂ = 12); RAC-PCP (raclopride and phencyclidine-exposed, ♀ = 12, ♂ = 12); and NIC-RAC-PCP (nicotine, raclopride and phencyclidine-exposed, ♀ = 14, ♂ = 12). Similar to HAB, the experimental design of ACQ allowed separate analyses of day-to-day and interval-to-interval alterations in ambulation. However, the pharmacological treatments during ACQ further allowed the investigation of the impact of raclopride and its interactions with nicotine exposure, the evaluation of

locomotor effects of phencyclidine and the interference of nicotine and raclopride throughout the experimental days and intervals.

The period of phencyclidine exposure was chosen based on evidence that the prodromal stage of SCHZ begins early, still during adolescence (Häfner, 2019; Miller et al., 2003; Tandon et al., 2009) and that, in most cases, the first psychotic event occurs between late adolescence and early adulthood (Chen et al., 2018; Tandon et al., 2009). The dose was chosen based on previous studies that show phencyclidine-evoked locomotor sensitization (Castañé et al., 2015; Tran et al., 2018). The raclopride dose was selected based on evidence that it antagonizes both dopamine-mediated behaviors (Mohd-Yusof et al., 2016) as well as behaviors affected by NMDA antagonists (Martin et al., 1997; Ögren and Goldstein, 1994). The 10-min interval between raclopride and phencyclidine injections was based on previous studies (Galvanho et al., 2020).

ACQ was followed by the Withdrawal phase, which lasted 5 days (PN51-55). During this phase, animals were left undisturbed in our animal facility. After that, on the last day of the protocol (PN56), the Sensitization Test (ST) took place. To follow the same protocol used in previous phases, the test began with all animals being tested in the open field for 10 min. After that, all mice received a saline injection and were placed back in the open field. Lastly, half of mice from each ACQ group received a phencyclidine challenge (10 mg/Kg, s.c.) and the other half received a nicotine challenge (0.5 mg/Kg, s.c.) before being placed back in the open field for additional 40 min. The dose of nicotine was chosen due to previous evidence that it increases locomotor activity in mice (Celik et al., 2006; Dutra-Tavares et al., 2015). The analysis of the pre-challenge intervals of ST (intervals 1 and 2) allowed the investigation of persistent long-lasting effects of drugs administered during previous phases of the experimental protocol. The third and fourth intervals of ST investigated whether the previous drugs exposures interfered with the expression of phencyclidine-evoked locomotor sensitization. The nicotine challenge further made it possible to verify the expression of cross-sensitization, and the possible interference of previous drugs exposures in this outcome.

Figure 1 about here.

2.4. Statistical analysis

To reduce the likelihood of type 1 statistical errors that might result from repeated testing, data on each phase of the experiment (HAB, ACQ and ST) were evaluated first by

global repeated measures analyses of variance (rANOVAs). Within-subject factors were: Day and Interval. Nicotine (exposed: NIC-PCP and NIC-RAC-PCP groups; non-exposed: PCP and RAC-PCP groups), Raclopride (exposed: RAC-PCP and RAC-NIC-PCP groups; non-exposed: PCP and NIC-PCP groups), and Sex were the between-subject factors. Challenge was an additional factor for ST. Lower-order rANOVAs on each day and/or interval, univariate ANOVAs (uANOVAs), Fisher Protected Least Significant Difference tests (FPLSD) and Paired t-tests were used post hoc where appropriate.

One of the criteria necessary to characterize both development and expression of behavioral sensitization is a significant increase in activity in phencyclidine-exposed mice when compared to control ones. Since all experimental groups received phencyclidine in the ACQ phase, its hyperlocomotor effect (and the interference of nicotine and raclopride) was verified through comparisons between HAB3 and ACQ1 for each experimental group. The development of sensitization is further characterized by a significant increase in activity throughout ACQ (ACQ1 to ACQ6) in a given group. Regarding, the expression of sensitization, it must also include a significant increase in activity from ACQ1 to ST.

All data were analyzed using the IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0 (IBM Corp, Armonk, N.Y., U.S.A.) and compiled as means and standard errors. Significance was assumed at the level of $p < 0.05$ for main effects; however, for interactions at $p < 0.1$, we also examined whether lower-order main effects were detectable after subdivision of the interactive variables (Snedecor and Cochran, 1967). The criterion for interaction terms was not used to assign significance to the effects but rather to identify interactive factors requiring subdivision for lower-order tests of main effects (Snedecor and Cochran, 1967).

3. RESULTS

3.1. Habituation (Fig. 2)

During this phase of the experiment, mice from NIC and CT groups explored the open field. The rANOVA clearly showed that both interday (Day: $F_{(2,180)}=53.4$; $p<0.001$) and intraday (Interval: $F_{(3,270)}=581.8$; $p<0.001$) habituation were present but that both were modified by nicotine exposure (Day $\times$ Nicotine: $F_{(2,180)}=2.9$; $p=0.058$; Interval $\times$ Nicotine: $F_{(3,270)}=3.9$; $p=0.009$). Furthermore, a main nicotine effect was observed ($F_{(1,90)}=5.2$; $p=0.024$), indicating that nicotine exposure increased overall locomotion in the open field

when compared to CT. Lower-order rANOVAs segmented by habituation day indicated that the increased locomotor effect of nicotine was restricted to HAB1 (Nicotine: $F_{(1,94)}=10.8$; $p=0.001$; Interval $\times$ Nicotine: $F_{(3,282)}=2.6$; $p=0.054$), which suggests that the novelty of the test potentiated its effects. On HAB1, the hyperlocomotor effect of nicotine reached significance in the first (Nicotine: $F_{(1,94)}=8.7$; $p=0.004$) and last (Nicotine: $F_{(1,94)}=16.3$; $p<0.001$) intervals (Fig. 2A). The fact that nicotine failed to significantly increase locomotion in the second and third intervals suggests that the stress generated by the injections was capable of hampering, in the short term, nicotine stimulatory effects on locomotion. To verify whether both groups independently showed habituation, Paired *t*-tests on each group were carried out and results indicated that activity in HAB1 was highest in both groups and that no differences between HAB2 and HAB3 were present in both groups (Fig. 2B), which indicates that behavior was stable by the end of this phase of the protocol.

Figure 2 about here.

3.2. Acquisition (Figs. 3 and 4 and Supplementary Tables 1 to 3)

ACQ began on the day after HAB3. To evaluate the time course of changes in phencyclidine-evoked locomotion, which includes the possibility of the development of locomotor sensitization, mice received daily injections of phencyclidine for 6 consecutive days. Exposure to nicotine and raclopride further allowed the identification of the impact of these drugs on phencyclidine-evoked behavior. All mice were tested in the open field from ACQ1 to ACQ6.

The global rANOVA (Supplementary Table 1) indicated that both nicotine and raclopride interfered with phencyclidine-evoked hyperlocomotion, however, their effects were not homogeneous throughout ACQ days and intervals. The lower order rANOVAs results on each day (Supplementary Table 1) further confirmed that locomotor activity varied as a function of nicotine, raclopride and interval. Therefore, subsequent ANOVAs on each day and interval were run.

3.2.1. First interval

In the first interval, mice had not received daily injections of raclopride and phencyclidine. Its analysis demonstrated few effects of nicotine. There were no differences between groups at ACQ1, 2 and 4. Distinctively, at the other days, there were clear effects:

At ACQ3, nicotine-exposed groups were more active than non-exposed ones (Nicotine: $F_{(1,90)} = 4.3$, $p = 0.041$); at ACQ5 (Nicotine $\times$ Raclopride: $F_{(1,90)} = 6.1$, $p = 0.016$), NIC-PCP mice were more active than all other groups and, at ACQ6 (Nicotine $\times$ Raclopride: $F_{(1,90)} = 3.7$, $p = 0.058$), NIC-PCP mice were more active than PCP ones (Fig. 3). The longitudinal analysis of the first interval failed to identify residual effects of previous drugs exposures throughout ACQ days (Fig. 4B and Supplementary Table 3). There were also no differences between HAB3 and ACQ1 (Fig. 4A and Supplementary Table 2), confirming that ambulation values at HAB3 can be considered as baseline activity for further comparisons within each experimental group.

Figures 3 and 4 about here.

3.2.2. Second interval

Consistent with the established role of the D₂R on locomotion, the analysis of the second interval revealed a major depressive effect of raclopride. On ACQ1, 4, 5 and 6 (Raclopride: $F_{(1,90)} = 24.9$, $p < 0.001$; $F_{(1,90)} = 26.1$, $p < 0.001$; $F_{(1,90)} = 37.8$, $p < 0.001$ and $F_{(1,90)} = 32.5$, $p < 0.001$, respectively), raclopride-exposed groups were less active than non-exposed ones (Fig. 3). Distinctively, on ACQ2 (Raclopride: $F_{(1,90)} = 21.5$, $p < 0.001$; Nicotine $\times$ Raclopride: $F_{(1,90)} = 5.6$, $p = 0.020$) and ACQ3 (Raclopride: $F_{(1,90)} = 28.8$, $p < 0.001$; Nicotine $\times$ Raclopride: $F_{(1,90)} = 9.6$, $p = 0.003$), nicotine co-exposure interfered with raclopride effects, so that NIC-RAC-PCP activity was even lower than that identified in RAC-PCP mice (Fig. 3), which indicates that nicotine exposure accentuated the hypolocomotor effect of raclopride.

The longitudinal analysis of the second interval indicated that, from HAB3 to ACQ1, both RAC-PCP and NIC-RAC-PCP groups exhibited a reduction in locomotor activity (Fig. 4A and Supplementary Table 2), which confirms the inhibitory effect of raclopride. This effect was not potentiated by raclopride repeated exposure since there were no further decreases in locomotion for both NIC-RAC and NIC-RAC-PCP when ACQ6 was compared to ACQ1 (Fig. 4B and Supplementary Table 3). Interestingly, NIC-PCP was the only group that exhibited a modest but significant reduction in locomotion throughout ACQ (Fig. 4B), which indicates a progressive fading of the stimulatory effect of nicotine.

3.2.3. Third interval

Immediately before the third interval, all mice received an injection of phencyclidine. Accordingly, the initial assessment of whether this drug, at the dose used, was capable of increasing locomotion, was possible by comparing baseline activities at HAB3 to locomotor activity at ACQ1. This comparison (longitudinal analysis) revealed that phencyclidine-evoked effects were not homogeneous throughout experimental groups (Supplementary Table 2). While both PCP and NIC-PCP mice increased locomotor activity in response to phencyclidine exposure, raclopride prevented this effect so that, for the RAC-PCP group, there were no differences between HAB3 and ACQ1 (Fig. 4A). Interestingly, nicotine further potentiated the inhibitory effect of raclopride so that NIC-RAC-PCP mice were hypoactive in ACQ1 when compared to HAB3 (Fig. 4A).

These results are consistent with the analysis of locomotor activity on ACQ1 (Raclopride: $F_{(1,90)}=40.7$, $p<0.001$; Nicotine $\times$ Raclopride: $F_{(1,90)}=5.4$, $p=0.022$). The hyperlocomotor effect of phencyclidine, evident in PCP and NIC-PCP mice, was hindered by raclopride exposure (Fig. 3). In addition, NIC-RAC-PCP exhibited lower activity than RAC-PCP mice (Fig. 3), which confirmed that nicotine exposure accentuated the hypolocomotor effect of raclopride. These effects were not restricted to ACQ1. At ACQ2 (Raclopride: $F_{(1,90)}=27.6$, $p<0.001$; Nicotine $\times$ Raclopride: $F_{(1,90)}=3.9$, $p=0.050$) and ACQ3 (Raclopride: $F_{(1,90)}=32.4$, $p<0.001$; Nicotine $\times$ Raclopride: $F_{(1,90)}=4.4$, $p=0.039$), similar differences between groups were identified (Fig. 3). On ACQ4, 5 and 6 (Raclopride: $F_{(1,90)}=13.1$, $p<0.001$; $F_{(1,90)}=6.6$, $p=0.012$ and $F_{(1,90)}=40.0$, $p<0.001$, respectively), raclopride-exposed groups were less active than non-exposed ones, however, nicotine no longer interfered with the results (Fig. 3). It should be noted that there were no differences between PCP and NIC-PCP mice throughout ACQ, which indicates that nicotine, *per se*, had a null impact on locomotion in mice modelled to SCHZ. Therefore, the reduced locomotion in NIC-RAC-PCP when compared to RAC-PCP identified at ACQ1, ACQ2 and ACQ3 are largely due to interactive events between nicotine and raclopride.

The longitudinal analysis of ACQ (Supplementary Table 3) identified a progressive increase in locomotion from ACQ1 to ACQ6 in PCP and NIC-PCP mice (Fig. 4B). These increases are consistent with the development of phencyclidine-evoked locomotor sensitization and, together with day-to-day analyses described previously, indicate that nicotine, *per se*, did to interfere with phencyclidine-evoked stimulatory effects in locomotion. Conversely, a similar increase was not identified in RAC-PCP mice, which

further demonstrates that raclopride reduced the impact of phencyclidine on locomotion. Interestingly, despite the inhibitory effects of raclopride, NIC-RAC-PCP locomotor activity increased throughout ACQ (Fig. 4B). This effect was due to the fact that the more potent inhibitory effect raclopride when combined to nicotine, which led to very low activity levels on the first days of sensitization, faded throughout ACQ. Accordingly, while at ACQ1, NIC-RAC-PCP locomotion was lower than that identified for all other groups, it partially increased throughout ACQ, so that, at ACQ6, NIC-RAC-PCP and RAC-PCP activities were equivalent (Fig. 4B). It should be noted, however, that despite this increase, NIC-RAC-PCP activity levels never reached those identified in PCP and NIC-PCP mice, being equivalent to activity levels observed at HAB3. Altogether, these results indicate that the behavior of NIC-RAC-PCP throughout ACQ fails to characterize locomotor sensitization.

3.2.4. Fourth interval

The fourth interval, that was initiated 10 min after phencyclidine exposure, allowed for the investigation of the persistence of effects at each test day and throughout ACQ. The comparison between baseline activities at HAB3 and locomotor activity at ACQ1 (Fig. 4A and Supplementary Table 2) revealed persistent hyperlocomotor effects of phencyclidine in both PCP and NIC-PCP groups, although the magnitude of the increase was smaller than that identified in interval 3. There were no longer significant effects or interactions involving nicotine, and raclopride-exposed mice became less active than non-exposed ones at ACQ1, a difference that was not present at HAB3 (Fig. 4A). The day-to-day analysis of the fourth interval confirmed a major depressive effect of raclopride on phencyclidine-evoked hyperlocomotion. On ACQ1, 2, 3, 4 and 6 (Raclopride: $F_{(1,90)}=14.2$, $p<0.001$; $F_{(1,90)}=6.6$, $p=0.012$; $F_{(1,90)}=7.8$, $p=0.006$; $F_{(1,90)}=76.7$, $p=0.011$ and $F_{(1,90)}=24.3$, $p<0.001$, respectively), raclopride-exposed groups were less active than non-exposed ones (Fig. 3).

The longitudinal analysis of ACQ (Supplementary Table 3) identified progressive increases in locomotion from ACQ1 to ACQ6 in PCP and NIC-PCP mice, consistent with the development of phencyclidine-evoked locomotor sensitization and similar to those results identified at the third interval, albeit of smaller magnitude (Fig. 4B). Also similar to the third interval, raclopride prevented mice from developing locomotor sensitization (Fig. 4B). However, in the fourth interval, nicotine no longer interfered with raclopride-mediated results.

3.3. Sensitization Test (Fig. 5 and Supplementary Tables 4 and 5)

To evaluate the expression of locomotor sensitization, following ACQ and after 5 days of drugs withdrawal, half of mice from each experimental group were challenged with phencyclidine (10 mg/Kg, s.c.) and the other half with nicotine (0.5 mg/Kg, s.c.). To follow a protocol similar to the one used during ACQ, before the challenge, mice explored the open field arena for a 10 min period, and then, received a saline injection, which was followed by additional 10 min in the arena. Accordingly, the factor Challenge was only considered in the analysis of the last 2 intervals (3rd and 4th) (Supplementary Tables 4 and 5).

3.3.1. First and second intervals

The rANOVA of ST (Supplementary Table 4), that considered intervals 1 and 2 as repeated measures, indicated that mice were more active at the first interval of ST when compared to the second, irrespective of previous drug treatments (Fig. 5A, left). The comparative analysis of ACQ1 and ST (Fig. 5B, left and Supplementary Table 5) further confirmed a more active profile at ST. At the first interval, all 4 experimental groups were more active at ST (Fig. 5B, left). The increased exploratory activity may be due to the 5-day withdrawal period, during which mice were not tested in the open field. At the second interval, the increased activity at ST was still evident in PCP but not in NIC-PCP mice. Mice exposed to raclopride during ACQ were no longer hypoactive at ST, which indicates that there were no residual inhibitory effects of this drug at ST baseline (Fig. 5B, left).

Figure 5 about here.

3.3.2. Third and fourth intervals

The global ANOVA on ST (Supplementary Table 4) and the rANOVA longitudinal analysis (Supplementary Table 5) comparing ACQ1 and ST locomotor activities indicated that phencyclidine challenge had a major impact in locomotion. The rANOVAs on each challenge and interval demonstrated that, at the third interval, all groups were hyperactive at ST when compared to ACQ1 (Day: $F_{(1,41)}=42.5$, $p<0.001$) (Fig. 5B, center). Even though mice exposed to raclopride had lower activities than non-exposed ones at ACQ1, raclopride-exposed mice exhibited a steeper increase than non-exposed ones (Raclopride: $F_{(1,41)}=6.8$, $p=0.012$) so that, at ST, there were no differences between groups (Fig. 5A,

center). These results indicate that all groups expressed phencyclidine-evoked locomotor sensitization.

At the fourth interval, phencyclidine challenge still impacted locomotion (Day: $F_{(1,41)}=5.7$, $p=0.022$), but its effects were modified by nicotine and raclopride pre-exposures (Raclopride: $F_{(1,41)}=9.8$, $p=0.003$; Day $\times$ Nicotine: $F_{(1,41)}=9.0$, $p=0.005$). The hyperlocomotor effect of phencyclidine challenge was strong in the PCP group: Mice from this group were hyperactive at ST when compared to ACQ1 (Fig. 5B, center), which indicates that the expression of locomotor sensitization identified at the third interval persisted throughout ST. The analysis of ST (Supplementary Table 4) (Nicotine: $F_{(1,41)}=6.2$, $p=0.017$; Raclopride: $F_{(1,41)}=5.0$, $p=0.030$) further corroborated this conclusion, as PCP mice were hyperactive when compared to all other groups (Fig. 5A, center). RAC-PCP mice were also more active at ST when compared to ACQ1, however, the increase in locomotion was much less robust than that identified at the third interval (Fig. 5B, center) and failed to reach PCP values (Fig. 5A, center), which indicates that raclopride pre-exposure blunted the magnitude and reduced the duration of the expression of phencyclidine-evoked locomotor sensitization. NIC-PCP and NIC-RAC-PCP had comparable activities at ACQ1 and ST, indicative that, in these groups, the stimulatory effects of phencyclidine challenge identified at interval 3 were not long-lasting, failing to persist throughout ST (Fig. 5B, center). This result leads to the conclusion that nicotine exposure during ACQ shortened the expression of phencyclidine-evoked locomotor sensitization.

The impact of nicotine challenge was mild when compared to phencyclidine challenge both in the third (Raclopride: $F_{(1,41)}=7.2$, $p=0.01$; Day $\times$ Raclopride: $F_{(1,41)}=16.3$, $p<0.001$) and fourth (Day $\times$ Nicotine: $F_{(1,41)}=4.1$, $p=0.050$; Day $\times$ Raclopride: $F_{(1,41)}=3.0$, $p=0.092$) intervals. There was a transitory decrease in PCP and NIC-PCP activities during the third interval of ST when compared to ACQ1 (Fig. 5B, right). Distinctively, raclopride-exposed mice were more active at ST than at ACQ1. For RAC-PCP mice, this effect was transitory, being no longer evident during the fourth interval. As for NIC-RAC-PCP, it persisted at the fourth interval (Fig. 5B, right). It should be noted, however, that the analysis of ST failed to demonstrate significant differences between experimental groups at both the third and fourth intervals (Fig. 5A, right), which indicates that the inhibitory effect of nicotine and raclopride combined exposures during ACQ was the most important contributing factor to NIC-RAC-PCP results.

4. DISCUSSION

Adolescence is a period of brain development during which SCHZ and nicotine misuse co-morbidity becomes evident. Here, we investigated interactive events that might underlie the early establishment of this condition by assessing locomotor sensitization in an adolescent mouse model of phencyclidine-induced psychosis and combined nicotine exposure and by testing the role of D₂R.

An increase in locomotor activity was identified in the very first day of phencyclidine exposure and escalated in response to repeated exposures during ACQ, which characterizes the development of locomotor sensitization and corroborates recent findings in adolescent mice (Dutra-Tavares et al., 2021). Together with evidence of stronger locomotor responses to both acute and subchronic phencyclidine in adolescent when compared to adult rats (Rocha et al., 2017), these data are aligned with previous findings of an increased susceptibility of the adolescent brain to SCHZ (Häfner, 2019; Miller et al., 2003; Tandon et al., 2009). The shift in NMDAR subunit composition from a predominant GluN2B-containing to NMDAR containing GluN2A representation that occur during brain development may contribute to age-related differences in locomotor sensitization, since NMDAR subunit composition determines its functional properties (Wyllie et al., 2013). Our results also showed that a phencyclidine challenge after a 5-day withdrawal phase resulted in higher locomotor activity than that identified in the beginning of ACQ. This corroborates previous evidence that mice exposed to phencyclidine during adolescence express locomotor sensitization (Freeman et al., 2017; Qiao et al., 2014), and suggests that the mechanisms that lead to this hyperlocomotor effect can be promptly activated even after a period of withdrawal.

Despite the established role of NMDARs in synaptic plasticity processes (Hardingham, 2019), the mechanisms by which repeated phencyclidine exposure causes locomotor sensitization are not fully understood. However, it is consensus that, similar to what is described in SCHZ patients (Goff and Coyle, 2001; Javitt et al., 2012; Lin et al., 2012), the effects of phencyclidine include the dysregulation of mesolimbic DA transmission (Carlezon and Wise, 1996; Hernandez et al., 1988; Kohli et al., 2019). The use of raclopride reinforces the D₂R-mediated DA transmission as an endpoint of phencyclidine-evoked hyperlocomotor effects (Qiao et al., 2014; Svensson, 2000): Regarding RAC-PCP mice, raclopride reduced locomotor activity to HAB3 levels, and

prevented the development of phencyclidine-evoked locomotor sensitization. The development period of sensitization is associated with transient neuronal maladaptive alterations (Cador et al., 1995; Pierce and Kalivas, 1995; Vezina, 2004). Accordingly, the lack of sensitization in RAC-PCP mice during ACQ indicates that raclopride prevented phencyclidine-evoked neuroplastic changes. During ST, i.e., five days after the last raclopride exposure, RAC-PCP mice transiently expressed phencyclidine-evoked sensitization, which indicates that raclopride residual effects were not strong enough to fully prevent the hyperlocomotor effect of phencyclidine challenge. The expression phase of sensitization reflects persistent neuronal adaptive alterations evoked by prior psychostimulant exposure (Cador et al., 1995; Pierce and Kalivas, 1995; Vezina, 2004). Thus, raclopride pre-exposure during ACQ was only partially efficient in preventing long-lasting neural circuitry modifications, which might be explained by the functional hyperactivity described to occur in the adolescent mesolimbic system (Abreu-Villaça et al., 2017). Distinctively, it is also possible that neuroadaptations underlying phencyclidine locomotor sensitization are not exclusively dependent on D₂R function. In this regard, previous studies suggest that rather than an increased D₂R function, an imbalance in mesolimbic signaling of ventral tegmental area dopaminergic neurons and their output D₁R and D₂R substrates in the NAcc is key to the positive symptomatology of SCHZ (Guillin et al., 2007).

Nicotine actions in the brain reward system are multiple and, during adolescence, the expression of nAChRs are elevated (Azam et al., 2007; Doura et al., 2008), which might potentiate the effects of this drug of abuse. Ventral tegmental area dopaminergic neurons that project to the NAcc are directly activated by nicotine binding to postsynaptic nAChRs, as well as indirectly by its binding to presynaptic nAChRs located in terminals of glutamatergic neurons that, in turn, modulate the activity of those dopaminergic neurons (Abreu-Villaça et al., 2017; Wills et al., 2022). In this regard, nicotine self-administration was shown to upregulate the expression of NMDA receptors subunits in mesolimbic regions including the ventral tegmental area (Alasmari et al., 2016). During adolescence, nicotine systemic administration increases the AMPA/NMDA receptors ratio in the ventral tegmental area, which suggests an increased sensitivity to nicotine-induced, and NMDAR-mediated, synaptic plasticity (Placzek et al., 2009). Nicotine is also thought to increase DA release in the NAcc by desensitizing β 2-subunit containing (β 2*) nAChRs expressed in striatal dopaminergic terminals (Salminen et al., 2004) and, as a result, reduce the inhibitory control of DA release exerted by cholinergic interneurons (Yavas and Young,

2020). All aforementioned mechanisms are consistent with the nicotine-evoked hyperlocomotor effect identified during HAB and the first interval of ACQ days.

It should be noted, however, that the current set of results indicate that nicotine neither accentuated nor mitigated the development of phencyclidine-evoked locomotor sensitization. Administration of NMDAR antagonists both systemically and into the ventral tegmental area was shown to inhibit nicotine-evoked release of DA in NAcc, possibly by blocking nicotine-mediated activation of NMDARs (Alasmari et al., 2016). These data suggest that, despite similar results when comparing PCP and NIC-PCP mice during ACQ, in mice exposed to nicotine, relevant two-way interactions between the glutamatergic and cholinergic systems take place. This conclusion is corroborated by the inhibitory effect of nicotine pre-exposure in the expression of phencyclidine-evoked locomotor sensitization during ST. In the absence of nicotine-stimulatory effects, the phencyclidine challenge by itself was insufficient to cause a long-lasting hyperlocomotor response consistent with the expression of sensitization. This suggests that adaptative events that took place during the period of nicotine exposure mitigated the response to phencyclidine challenge, ameliorating phencyclidine-sensitized psychotic-like behavior in adolescent mice. Similar observations have been reported in which nicotine history during adolescence was associated with remediation of SCHZ-like symptoms, including behaviors associated with positive symptoms of this disease (Dutra-Tavares et al., 2021).

In apparent contradiction to the aforementioned results, nicotine accentuated the hypolocomotor effect of raclopride in the first ACQ days. Even though the mechanisms responsible are yet to be clarified, this result points to multi-synaptic events involving glutamatergic, cholinergic and dopaminergic systems. The stronger hypolocomotor outcome in NIC-RAC-PCP when compared to RAC-PCP mice suggests that the phencyclidine-mediated blockade of the stimulatory effect of nicotine on NMDARs adds to the raclopride-evoked D₂R hypofunction. These data imply that D₂Rs are a common endpoint of both phencyclidine and nicotine actions leading to altered locomotor activity. In case similar events take place in SCHZ patients, these results suggest that nicotine improves the therapeutic efficacy of medication on psychotic symptoms through mechanisms that converge on D₂R. In accordance with these data, a recent study demonstrated better improvement of psychotic symptoms in SCHZ smokers than in non-smokers when first introduced with antipsychotics (Fang et al., 2019). It should be noted, however, that the hypolocomotor effect identified in NIC-RAC-PCP was not long lasting, fading throughout ACQ. These data suggest a transitory beneficial effect of nicotine and

explain the lack of a favorable outcome in previous studies in which adult patients were under antipsychotic medication for long periods (Sagud et al., 2019).

Nicotine challenge had no relevant stimulatory effect on locomotion during ST, which is consistent with a lack of phencyclidine/nicotine cross-sensitization. Similar observations have been reported in which acute nicotine administration one day after the end of a 14th period of phencyclidine exposure failed to increase locomotion in adult mice (Noda et al., 2021), but see (Volf et al., 2012).

The period of adolescence is critical for the establishment of nicotine addiction and SCHZ comorbidity. Despite that, scant studies in animal models of SCHZ and nicotine exposure investigated interactions between these conditions during this period of development. Here, we demonstrated that nicotine exposure during adolescence failed to interfere with phencyclidine-evoked development of locomotor sensitization, but nicotine history mitigated its expression, indicating that nicotine does not worsen, and may even ameliorate, phencyclidine-sensitized psychotic-like behavior in adolescent mice. Also, the fact that nicotine potentiated raclopride inhibitory effects points to D₂Rs as a common endpoint of both phencyclidine and nicotine actions. Even though some traits of the adolescent brain raise the possibility that age-related differences in brain function contribute to the current set of findings, many gaps remain to be filled. Particularly, future studies that manipulate the subunit composition of NMDAR and/or nAChR in brain regions that compose the mesolimbic pathway may add to the current knowledge of the roles of specific components of key neurotransmitter systems in the cascades of events that culminate in the positive symptomatology of SCHZ.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Timeline of sensitization protocol. Throughout HAB and until the last day of ACQ, mice were under constant nicotine (* 24 mg/Kg/day) or Milli-Q water exposure via osmotic minipumps (Exposure 1). Mice were tested in an open field once daily for 60 min. After 10 min of exploration, mice received the first injection (Exposure 2) and were placed back in the open field. After 10 min, mice received a second injection (Exposure 3) and were allowed to explore the arena for additional 40 min. During HAB, Exposures 2 and 3 consisted of saline s.c. injections. During ACQ, as Exposure 2, mice either received raclopride (** 0.5 mg/Kg, s.c.) or saline. As Exposure 3, all mice received phencyclidine

(*** 10 mg/Kg, s.c.). During ST, all mice received saline as Exposure 2. Exposure 3 consisted of a challenged with phencyclidine (*** 10 mg/Kg, s.c.) or nicotine (# 0.5 mg/Kg, s.c.). Experimental Groups: HAB – CT, control group; NIC, nicotine-exposed. ACQ and ST – PCP, phencyclidine-exposed; NIC-PCP, nicotine-exposed and phencyclidine-exposed; RAC-PCP, raclopride and phencyclidine-exposed; NIC-RAC-PCP: nicotine, raclopride and phencyclidine-exposed.

Figure 2. Distance travelled as a measure of locomotor activity in the open field during the Habituation (HAB) phase. **A.** Locomotor activity at each HAB day and interval. **B.** Intertest variation within each group. The test in each day (HAB1, HAB2 and HAB3) lasted 60 min, which were divided into 3 intervals of 10 min and a fourth interval expressed as the mean locomotor value of the last 30 min of the test. Mice were under constant exposure of nicotine via osmotic minipumps (NIC group, 24 mg/Kg/day, s.c.) or Milli-Q water (CT group). There were no additional drug treatments during HAB, however, mice received saline injections before intervals 2 and 3. Values are means $\pm$ S.E.M. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, FPLSD in A and paired t-tests in B.

Figure 3. Locomotor activity in the open field during each Acquisition (ACQ) day and interval. **Upper panel:** Distance travelled. **Lower panels:** For main effects, the percentage of non-exposed (% of N-e) traveled distance; for interactions, the percentage of PCP (% of PCP) traveled distance. The test in each day lasted 60 min, which were divided into 3 intervals of 10 min and a fourth interval expressed as the mean locomotor value of the last 30 min of the test. Mice were under constant exposure of nicotine (24 mg/Kg/day, s.c. minipump) or Milli-Q water. Mice received daily injections of raclopride (0.5 mg/Kg, s.c.) or saline immediately before interval 2. Before interval 3, all mice received daily injections of phencyclidine (10 mg/Kg, s.c.). There were no additional treatments at the fourth interval. Experimental groups: PCP, phencyclidine-exposed; NIC-PCP, nicotine and phencyclidine-exposed; RAC-PCP, raclopride and phencyclidine-exposed; NIC-RAC-PCP, nicotine, raclopride and phencyclidine-exposed. Values are means $\pm$ S.E.M. R, main raclopride effect; N, main nicotine effect, N $\times$ R, nicotine and raclopride interaction. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. non-exposed; @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$, @@@ $p < 0.001$ vs. PCP; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. NIC-PCP; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$, vs. RAC-PCP, FPLSD.

Figure 4. Distance travelled as a measure of locomotor activity in the open field. **A.** Comparison between the third Habituation day (HAB3) and the first Acquisition day (ACQ1) locomotor activities at each interval. **B.** Comparison between ACQ1 and ACQ6 locomotor activities at each interval. The test in each day lasted 60 min, which were divided into 3 intervals of 10 min and a fourth interval expressed as the mean locomotor value of the last 30 min of the test. Mice were under constant exposure of nicotine (24 mg/Kg/day, s.c. minipump) or Milli-Q water. There were no additional drug treatments during HAB3, however, mice received saline injections before the second and third intervals. During ACQ, mice received daily injections of raclopride (0.5 mg/Kg, s.c.) or saline immediately before interval 2. Before interval 3, all mice received daily injections of phencyclidine (10 mg/Kg, s.c.). There were no additional treatments at the fourth interval.. Experimental groups: PCP, phencyclidine-exposed; NIC-PCP, nicotine- and phencyclidine-exposed; RAC-PCP, raclopride and phencyclidine-exposed; NIC-RAC-PCP, nicotine, raclopride and phencyclidine-exposed. Values are means $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. respective group; ## $p < 0.01$, raclopride-exposed vs. non exposed, FPLSD.

Figure caption: Figure 5. Distance travelled as a measure of locomotor activity in the open field. **A.** Sensitization test (ST): Intervals 1 and 2 (left), intervals 3 and 4 of phencyclidine-challenged (center) and nicotine-challenged (right) mice. **B.** Comparison between the first day of Acquisition (ACQ1) and ST locomotor activities at intervals 1 and 2 (left), intervals 3 and 4 of phencyclidine-challenged (center) and nicotine-challenged (right) mice. Each test lasted 60 min, which were divided into 3 intervals of 10 min and a fourth interval expressed as the mean locomotor value of the last 30 min of the test. During ACQ, mice were under constant exposure of nicotine (24 mg/Kg/day, s.c. minipump) or Milli-Q water and received daily injections of raclopride (0.5 mg/Kg, s.c.) or saline immediately before interval 2. Before interval 3, all mice received daily injections of phencyclidine (10 mg/Kg, s.c.). The ST took place after 5 days of drugs withdrawal. Mice received a saline injection before interval 2. Immediately before interval 3, half of mice received a phencyclidine challenge (10 mg/Kg, s.c.) and the other half received a nicotine challenge (0.5 mg/kg, s.c.). Experimental groups: PCP: Phencyclidine-exposed; NIC-PCP: Nicotine- and phencyclidine-exposed; RAC-PCP: Raclopride and phencyclidine-exposed; NIC-RAC-PCP: Nicotine, raclopride and phencyclidine-exposed. Values are means $\pm$

S.E.M. @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$, vs. PCP; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. respective group; ## $p < 0.01$, raclopride-exposed vs. non exposed, FPLSD.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING SOURCES

This work was supported by fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-BRAZIL, finance code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-BRAZIL), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ-BRAZIL) and Sub-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR2-UERJ) and grants from FAPERJ-BRAZIL (SEI-260003/001135/2020, E-26/200.957/2021 and E-26/202.792/2017 to YA-V; E-26/202.266/2018 to ACD-T) and CNPq-BRAZIL (304332/2016-0 and 304368/2020-2 to YA-V). The aforementioned funding sources had no role in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

The authors are thankful to Ulisses Risso for animal care.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Abi-Dargham, A., Gil, R., Krystal, J., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Bowers, M., van Dyck, C.H., Charney, D.S., Innis, R.B., Laruelle, M., 1998. Increased Striatal Dopamine Transmission in Schizophrenia: Confirmation in a Second Cohort. *Am. J. Psychiatry* 155, 761–767. <https://doi.org/10.1176/ajp.155.6.761>
- Abreu-Villaça, Y., Manhães, A.C., Krahe, T.E., Filgueiras, C.C., Ribeiro-Carvalho, A., 2017. Tobacco and alcohol use during adolescence: Interactive mechanisms in animal models. *Biochem. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.113>

- 741 Alasmari, F., Al-Rejaie, S.S., AlSharari, S.D., Sari, Y., 2016. Targeting glutamate
742 homeostasis for potential treatment of nicotine dependence. *Brain Res. Bull.* 121, 1–8.
743 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.11.010>
- 744 Azam, L., Chen, Y., Leslie, F.M., 2007. Developmental regulation of nicotinic
745 acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neuroscience* 144, 1347–
746 1360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.011>
- 747 Beraki, S., Diaz-Heijtz, R., Tai, F., Ögren, S.O., 2009. Effects of repeated treatment of
748 phencyclidine on cognition and gene expression in C57BL/6 mice. *Int. J.*
749 *Neuropsychopharmacol.* 12, 243. <https://doi.org/10.1017/S1461145708009152>
- 750 Bubeníková-Valešová, V., Horáček, J., Vrajová, M., Höschl, C., 2008. Models of
751 schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors.
752 *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1014–1023.
753 <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.012>
- 754 Cador, M., Bjijou, Y., Stinus, L., 1995. Evidence of a complete independence of the
755 neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization
756 to amphetamine. *Neuroscience* 65, 385–395.
757 [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00524-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00524-9)
- 758 Carlezon, W., Wise, R.A., 1996. Rewarding Actions of Phencyclidine and Related Drugs
759 in Nucleus Accumbens Shell and Frontal Cortex. *J. Neurosci.* 16, 3112 LP – 3122.
760 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-09-03112.1996>
- 761 Castañé, A., Santana, N., Artigas, F., 2015. PCP-based mice models of schizophrenia:
762 differential behavioral, neurochemical and cellular effects of acute and subchronic
763 treatments. *Psychopharmacology (Berl.)* 232, 4085–4097.
764 <https://doi.org/10.1007/s00213-015-3946-6>
- 765 Celik, E., Uzbay, I.T., Karakas, S., 2006. Caffeine and amphetamine produce cross-
766 sensitization to nicotine-induced locomotor activity in mice. *Prog. Neuro-*
767 *Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 30, 50–55.
768 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.06.014>
- 769 Chen, L., Selvendra, A., Stewart, A., Castle, D., 2018. Risk factors in early and late onset
770 schizophrenia. *Compr. Psychiatry* 80, 155–162.
771 <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2017.09.009>
- 772 Clayton, J.A., Collins, F.S., 2014. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies.
773 *Nature* 509, 282–283. <https://doi.org/10.1038/509282a>
- 774 Cullen, K.A., Ambrose, B.K., Gentzke, A.S., Apfelberg, B.J., Jamal, A., King, B.A., 2018.

- Notes from the Field: Use of Electronic Cigarettes and Any Tobacco Product Among Middle and High School Students — United States, 2011–2018. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 67, 1276–1277. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6745a5>
- Cullen, K.A., Liu, S.T., Bernat, J.K., Slavitt, W.I., Tynan, M.A., King, B.A., Neff, L.J., 2019. Flavored Tobacco Product Use Among Middle and High School Students — United States, 2014–2018. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 68, 839–844. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6839a2>
- Danielsson, K., Stomberg, R., Adermark, L., Ericson, M., Söderpalm, B., 2021. Differential dopamine release by psychosis-generating and non-psychosis-generating addictive substances in the nucleus accumbens and dorsomedial striatum. *Transl. Psychiatry* 11, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01589-z>
- Ding, J.B., Hu, K., 2021. Cigarette Smoking and Schizophrenia: Etiology, Clinical, Pharmacological, and Treatment Implications. *Schizophr. Res. Treatment* 2021, 7698030. <https://doi.org/10.1155/2021/7698030>
- Doura, M.B., Gold, A.B., Keller, A.B., Perry, D.C., 2008. Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res.* 1215, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.03.056>
- Dutra-Tavares, A.C., Manhães, A.C., Semeão, K.A., Maia, J.G., Couto, L.A., Filgueiras, C.C., Ribeiro-Carvalho, A., Abreu-Villaça, Y., 2021. Does nicotine exposure during adolescence modify the course of schizophrenia-like symptoms? Behavioral analysis in a phencyclidine-induced mice model. *PLoS One* 16, e0257986.
- Dutra-Tavares, A.C., Manhães, A.C., Silva, J.O., Nunes-Freitas, A.L., Conceição, E.P.S., Moura, E.G., Lisboa, P.C., Filgueiras, C.C., Abreu-Villaça, Y., Ribeiro-Carvalho, A., 2015. Locomotor response to acute nicotine in adolescent mice is altered by maternal undernutrition during lactation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 47, 278–285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.10.002>
- Engel, M., Snikeris, P., Jenner, A., Karl, T., Huang, X.-F., Frank, E., 2015. Neuregulin 1 Prevents Phencyclidine-Induced Behavioral Impairments and Disruptions to GABAergic Signaling in Mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, pyu114–pyu114. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu114>
- Fang, Y., Wang, W., Zhu, C., Lin, G.N., Cheng, Y., Zou, J., Cui, D., 2019. Use of tobacco in schizophrenia: A double-edged sword. *Brain Behav.* 9, e01433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/brb3.1433>

- Freeman, E., Lin, J., Chow, S., Davis, C., Li, M., 2017. Sex differences in aripiprazole sensitization from adolescence to adulthood. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 156, 39–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.04.001>
- Fusar-Poli, P., Meyer-Lindenberg, A., 2013. Striatal Presynaptic Dopamine in Schizophrenia, Part II: Meta-Analysis of [18F/11C]-DOPA PET Studies. *Schizophr. Bull.* 39, 33–42. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbr180>
- Galvanho, J.P., Manhães, A.C., Carvalho-Nogueira, A.C.C., Silva, J. de M., Filgueiras, C.C., Abreu-Villaça, Y., 2020. Profiling of behavioral effects evoked by ketamine and the role of 5HT2 and D2 receptors in ketamine-induced locomotor sensitization in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 97, 109775. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109775>
- Goff, D.C., Coyle, J.T., 2001. The Emerging Role of Glutamate in the Pathophysiology and Treatment of Schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 158, 1367–1377. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.9.1367>
- Gogos, A., Skokou, M., Ferentinou, E., Gourzis, P., 2019. Nicotine consumption during the prodromal phase of schizophrenia – a review of the literature. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* Volume 15, 2943–2958. <https://doi.org/10.2147/NDT.S210199>
- Grilli, M., Zappettini, S., Zoli, M., Marchi, M., 2009. Pre-synaptic nicotinic and D2 receptors functionally interact on dopaminergic nerve endings of rat and mouse nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 108, 1507–1514. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05933.x>
- Guillin, O., Abi-Dargham, A., Laruelle, M., 2007. Neurobiology of Dopamine in Schizophrenia. pp. 1–39. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)78001-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)78001-1)
- Häfner, H., 2019. From Onset and Prodromal Stage to a Life-Long Course of Schizophrenia and Its Symptom Dimensions: How Sex, Age, and Other Risk Factors Influence Incidence and Course of Illness. *Psychiatry J.* 2019, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/9804836>
- Hambach, B., Keyworth, H., Lind, J., Otte, D.M., Racz, I., Kitchen, I., Bailey, A., Zimmer, A., 2014. Chronic nicotine improves short-term memory selectively in a G72 mouse model of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1758–1771. <https://doi.org/10.1111/bph.12578>
- Hardingham, G.E., 2019. NMDA receptor C-terminal signaling in development, plasticity, and disease [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19925.1>

- Hernandez, L., Auerbach, S., Hoebel, B.G., 1988. Phencyclidine (PCP) injected in the nucleus accumbens increases extracellular dopamine and serotonin as measured by microdialysis. *Life Sci.* 42, 1713–1723. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(88\)90037-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90037-9)
- Javitt, D.C., Zukin, S.R., Heresco-Levy, U., Umbricht, D., 2012. Has an Angel Shown the Way? Etiological and Therapeutic Implications of the PCP/NMDA Model of Schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 38, 958–966. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs069>
- Jones, C.A., Watson, D.J.G., Fone, K.C.F., 2011. Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1162–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>
- Kohli, S., King, M. V, Williams, S., Edwards, A., Ballard, T.M., Steward, L.J., Alberati, D., Fone, K.C.F., 2019. Oxytocin attenuates phencyclidine hyperactivity and increases social interaction and nucleus accumbens dopamine release in rats. *Neuropsychopharmacology* 44, 295–305. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0171-0>
- Kumari, V., Postma, P., 2005. Nicotine use in schizophrenia: The self medication hypotheses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1021–1034. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.02.006>
- Lally, J., Spaducci, G., Gardner-Sood, P., Atakan, Z., Greenwood, K., Di Forti, M., Ismail, K., Murphy, K.C., Smith, S., McNeill, A., Murray, R.M., Gaughran, F., 2019. Tobacco smoking and nicotine dependence in first episode and established psychosis. *Asian J. Psychiatr.* 43, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2019.05.002>
- Lanza, S.T., Vasilenko, S.A., 2015. New methods shed light on age of onset as a risk factor for nicotine dependence. *Addict. Behav.* 50, 161–164. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2015.06.024>
- Large, C.H., 2007. Do NMDA receptor antagonist models of schizophrenia predict the clinical efficacy of antipsychotic drugs? *J. Psychopharmacol.* 21, 283–301. <https://doi.org/10.1177/0269881107077712>
- Lau, C.-I., Wang, H.-C., Hsu, J.-L., Liu, M.-E., 2013. Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia? *Rev. Neurosci.* 24. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2013-0011>
- Lin, C.-H., Lane, H.-Y., Tsai, G.E., 2012. Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of schizophrenia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 665–677. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.03.023>

- 877 Martin, P., Waters, N.R., Waters, S.E., Carlsson, A., Carlsson, M.L., 1997. MK-801-
878 induced hyperlocomotion: Differential effects of M100907, SDZ PSD 958 and
879 raclopride. *Eur. J. Pharmacol.* 335, 107–116.
880 [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01188-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01188-6)
- 881 Massadeh, A.M., Gharaibeh, A.A., Omari, K.W., 2009. A Single-Step Extraction Method
882 for the Determination of Nicotine and Cotinine in Jordanian Smokers' Blood and
883 Urine Samples by RP-HPLC and GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* 47, 170–177.
884 <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.2.170>
- 885 Miech, R., Johnston, L., O'Malley, P.M., Bachman, J.G., Patrick, M.E., 2019. Adolescent
886 Vaping and Nicotine Use in 2017–2018 — U.S. National Estimates. *N. Engl. J. Med.*
887 380, 192–193. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1814130>
- 888 Miller, T.J., McGlashan, T.H., Rosen, J.L., Cadenhead, K., Ventura, J., McFarlane, W.,
889 Perkins, D.O., Pearlson, G.D., Woods, S.W., 2003. Prodromal Assessment With the
890 Structured Interview for Prodromal Syndromes and the Scale of Prodromal
891 Symptoms: Predictive Validity, Interrater Reliability, and Training to Reliability.
892 *Schizophr. Bull.* 29, 703–715. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a007040>
- 893 Mohd-Yusof, A., Veliz, A., Rudberg, K.N., Stone, M.J., Gonzalez, A.E., McDougall, S.A.,
894 2016. Effects of D2 or combined D1/D2 receptor antagonism on the
895 methamphetamine-induced one-trial and multi-trial behavioral sensitization of
896 preweanling rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 233, 893–903.
897 <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4170-0>
- 898 Myles, N., Newall, H.D., Curtis, J., Nielssen, O., Shiers, D., Large, M., 2012. Tobacco use
899 before, at, and after first-episode psychosis: A systematic meta-analysis. *J. Clin.*
900 *Psychiatry* 73, 468–475. <https://doi.org/10.4088/JCP.11r07222>
- 901 Noda, Y., Soeda, K., Uchida, M., Goto, S., Ito, T., Kitagaki, S., Mamiya, T., Yoshimi, A.,
902 Ozaki, N., Mouri, A., 2021. Multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes
903 regulate social or cognitive behaviors in mice repeatedly administered phencyclidine.
904 *Behav. Brain Res.* 408, 113284.
905 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113284>
- 906 Nunes-Freitas, A.L., Ribeiro-Carvalho, A., Lima, C.S., Dutra-Tavares, A.C., Manhães,
907 A.C., Lisboa, P.C., Oliveira, E., Gaspar de Moura, E., Filgueiras, C.C., Abreu-Villaça,
908 Y., 2011. Nicotine Exposure during the Third Trimester Equivalent of Human
909 Gestation: Time Course of Effects on the Central Cholinergic System of Rats.
910 *Toxicol. Sci.* 123, 144–154. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr147>

- 911 Ögren, S.O., Goldstein, M., 1994. Phencyclidine- and Dizocilpine-Induced
 912 Hyperlocomotion Are Differentially Mediated. *Neuropsychopharmacology* 11, 167–
 913 177. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1380103>
- 914 Ohi, K., Shimada, T., Kuwata, A., Kataoka, Y., Okubo, H., Kimura, K., Yasuyama, T.,
 915 Uehara, T., Kawasaki, Y., 2019. Smoking Rates and Number of Cigarettes Smoked
 916 per Day in Schizophrenia: A Large Cohort Meta-Analysis in a Japanese Population.
 917 *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 22, 19–27. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy061>
- 918 Perälä, J., Suvisaari, J., Saarni, S.I., Kuoppasalmi, K., Isometsä, E., Pirkola, S., Partonen,
 919 T., Tuulio-Henriksson, A., Hintikka, J., Kieseppä, T., Härkänen, T., Koskinen, S.,
 920 Lönnqvist, J., 2007. Lifetime Prevalence of Psychotic and Bipolar I Disorders in a
 921 General Population. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 19–28.
 922 <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.1.19>
- 923 Pierce, R.C., Kalivas, P.W., 1995. Amphetamine produces sensitized increases in
 924 locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens shell
 925 of rats administered repeated cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 1019 LP – 1029.
- 926 Placzek, A.N., Zhang, T.A., Dani, J.A., 2009. Age dependent nicotinic influences over
 927 dopamine neuron synaptic plasticity. *Biochem. Pharmacol.* 78, 686–692.
 928 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.014>
- 929 Qiao, J., Gao, J., Shu, Q., Zhang, Q., Hu, G., Li, M., 2014. Long-lasting sensitization
 930 induced by repeated risperidone treatment in adolescent Sprague-Dawley rats: a
 931 possible D2 receptor mediated phenomenon? *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 1649–
 932 1659. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3386-0>
- 933 Quarta, D., Ciruela, F., Patkar, K., Borycz, J., Solinas, M., Lluís, C., Franco, R., Wise,
 934 R.A., Goldberg, S.R., Hope, B.T., Woods, A.S., Ferré, S., 2007. Heteromeric
 935 Nicotinic Acetylcholine–Dopamine Autoreceptor Complexes Modulate Striatal
 936 Dopamine Release. *Neuropsychopharmacology* 32, 35–42.
 937 <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301103>
- 938 Renda, A., Penty, N., Komal, P., Nashmi, R., 2016. Vulnerability to nicotine self-
 939 administration in adolescent mice correlates with age-specific expression of $\alpha 4^*$
 940 nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 108, 49–59.
 941 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.019>
- 942 Richtand, N.M., Woods, S.C., Berger, S.P., Strakowski, S.M., 2001. D3 dopamine
 943 receptor, behavioral sensitization, and psychosis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 427–
 944 443. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00023-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00023-9)

- 945 Rocha, A., Hart, N., Trujillo, K.A., 2017. Differences between adolescents and adults in
 946 the acute effects of PCP and ketamine and in sensitization following intermittent
 947 administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 157, 24–34.
 948 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.04.007>
- 949 Roth, B.L., Craig, S.C., Choudhary, M.S., Uluer, A., Monsma, F.J., Shen, Y., Meltzer,
 950 H.Y., Sibley, D.R., 1994. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-
 951 hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*
 952 268, 1403 LP – 1410.
- 953 Sagud, M., Mihaljevic Peles, A., Pivac, N., 2019. Smoking in schizophrenia: recent
 954 findings about an old problem. *Curr. Opin. Psychiatry* 32.
- 955 Salminen, O., Murphy, K.L., McIntosh, J.M., Drago, J., Marks, M.J., Collins, A.C., Grady,
 956 S.R., 2004. Subunit Composition and Pharmacology of Two Classes of Striatal
 957 Presynaptic Nicotinic Acetylcholine Receptors Mediating Dopamine Release in Mice.
 958 *Mol. Pharmacol.* 65, 1526 LP – 1535. <https://doi.org/10.1124/mol.65.6.1526>
- 959 Sams-Dodd, F., 1998. Effects of Continuous D-Amphetamine and Phencyclidine
 960 Administration on Social Behaviour, Stereotyped Behaviour, and Locomotor Activity
 961 in Rats. *Neuropsychopharmacology* 19, 18–25. [https://doi.org/10.1016/S0893-](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00200-5)
 962 [133X\(97\)00200-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00200-5)
- 963 Seeman, P., 2011. All Roads to Schizophrenia Lead to Dopamine Supersensitivity and
 964 Elevated Dopamine D2High Receptors. *CNS Neurosci. Ther.* 17, 118–132.
 965 <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00162.x>
- 966 Singh, T., Arrazola, R.A., Corey, C.G., Husten, C.G., Neff, L.J., Homa, D.M., King, B.A.,
 967 2016. Tobacco Use Among Middle and High School Students — United States,
 968 2011–2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 361–367.
 969 <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6514a1>
- 970 Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1967. *Statistical Methods*, 6th ed. University Press,
 971 Ames.
- 972 Spring, B., Pingitore, R., McChargue, D.E., 2003. Reward Value of Cigarette Smoking for
 973 Comparably Heavy Smoking Schizophrenic, Depressed, and Nonpatient Smokers.
 974 *Am. J. Psychiatry* 160, 316–322. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.2.316>
- 975 Strange, P.G., 2001. Antipsychotic Drugs: Importance of Dopamine Receptors for
 976 Mechanisms of Therapeutic Actions and Side Effects. *Pharmacol. Rev.* 53, 119 LP –
 977 134.
- 978 Svensson, T.H., 2000. Dysfunctional brain dopamine systems induced by psychotomimetic

- 979 NMDA-receptor antagonists and the effects of antipsychotic drugs. *Brain Res. Rev.*
 980 31, 320–329. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00048-X)
- 981 Sziráki, I., Seršen, H., Hashim, A., Lajtha, A., 2002. Receptors in the ventral tegmental
 982 area mediating nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens.
 983 *Neurochem. Res.* 27, 253–261. <https://doi.org/10.1023/A:1014844823534>
- 984 Tandon, R., Nasrallah, H.A., Keshavan, M.S., 2009. Schizophrenia, “just the facts” 4.
 985 Clinical features and conceptualization. *Schizophr. Res.* 110, 1–23.
 986 <https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.03.005>
- 987 Tran, T.-V., Park, S.J., Shin, E.-J., Tran, H.-Q., Jeong, J.H., Jang, C.-G., Lee, Y.J., Nah, S.-
 988 Y., Nabeshima, T., Kim, H.-C., 2018. Blockade of platelet-activating factor receptor
 989 attenuates abnormal behaviors induced by phencyclidine in mice through down-
 990 regulation of NF- κ B. *Brain Res. Bull.* 137, 71–78.
 991 <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.11.004>
- 992 van Os, J., Kapur, S., 2009. Schizophrenia. *Lancet* 374, 635–645.
 993 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60995-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60995-8)
- 994 van Zelst, C., 2009. Stigmatization as an Environmental Risk in Schizophrenia: A User
 995 Perspective. *Schizophr. Bull.* 35, 293–296. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn184>
- 996 Vezina, P., 2004. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-
 997 administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 827–
 998 839. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.001>
- 999 Volf, N., Hu, G., Li, M., 2012. Iptakalim Preferentially Decreases Nicotine-induced
 1000 Hyperlocomotion in Phencyclidine-sensitized Rats: A Potential Dual Action against
 1001 Nicotine Addiction and Psychosis. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 10, 168–179.
 1002 <https://doi.org/10.9758/cpn.2012.10.3.168>
- 1003 Wills, L., Ables, J.L., Braunscheidel, K.M., Caligiuri, S.P.B., Elayouby, K.S., Fillinger, C.,
 1004 Ishikawa, M., Moen, J.K., Kenny, P.J., 2022. Neurobiological Mechanisms of
 1005 Nicotine Reward and Aversion. *Pharmacol. Rev.* 74, 271 LP – 310.
 1006 <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000299>
- 1007 Winship, I.R., Dursun, S.M., Baker, G.B., Balista, P.A., Kandratavicius, L., Maia-de-
 1008 Oliveira, J.P., Hallak, J., Howland, J.G., 2018. An Overview of Animal Models
 1009 Related to Schizophrenia. *Can. J. Psychiatry* 64, 5–17.
 1010 <https://doi.org/10.1177/0706743718773728>
- 1011 Wood, T., Ellen Wewers, M., Groner, J., Ahijevych, K., 2004. Smoke constituent exposure
 1012 and smoking topography of adolescent daily cigarette smokers. *Nicotine Tob. Res.* 6,

- 1013 853–862. <https://doi.org/10.1080/1462220042000282537>
- 1014 Wyllie, D.J.A., Livesey, M.R., Hardingham, G.E., 2013. Influence of GluN2 subunit
1015 identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology* 74, 4–17.
1016 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.016>
- 1017 Yavas, E., Young, A.M.J., 2020. Repeated phencyclidine disrupts nicotinic acetylcholine
1018 regulation of dopamine release in nucleus accumbens: Implications for models of
1019 schizophrenia. *Neurochem. Int.* 140, 104836.
1020 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104836>
- 1021 Ziedonis, D., Hitsman, B., Beckham, J.C., Zvolensky, M., Adler, L.E., Audrain-
1022 McGovern, J., Breslau, N., Brown, R.A., George, T.P., Williams, J., Calhoun, P.S.,
1023 Riley, W.T., 2008. Tobacco use and cessation in psychiatric disorders: National
1024 Institute of Mental Health report. *Nicotine Tob. Res.* 10, 1691–1715.
1025 <https://doi.org/10.1080/14622200802443569>
1026

Figure 1

[Click here to access/download;Figure\(s\);Dutra-Tavares et al 2022 Fig 1.pptx](#) **Figure 1**

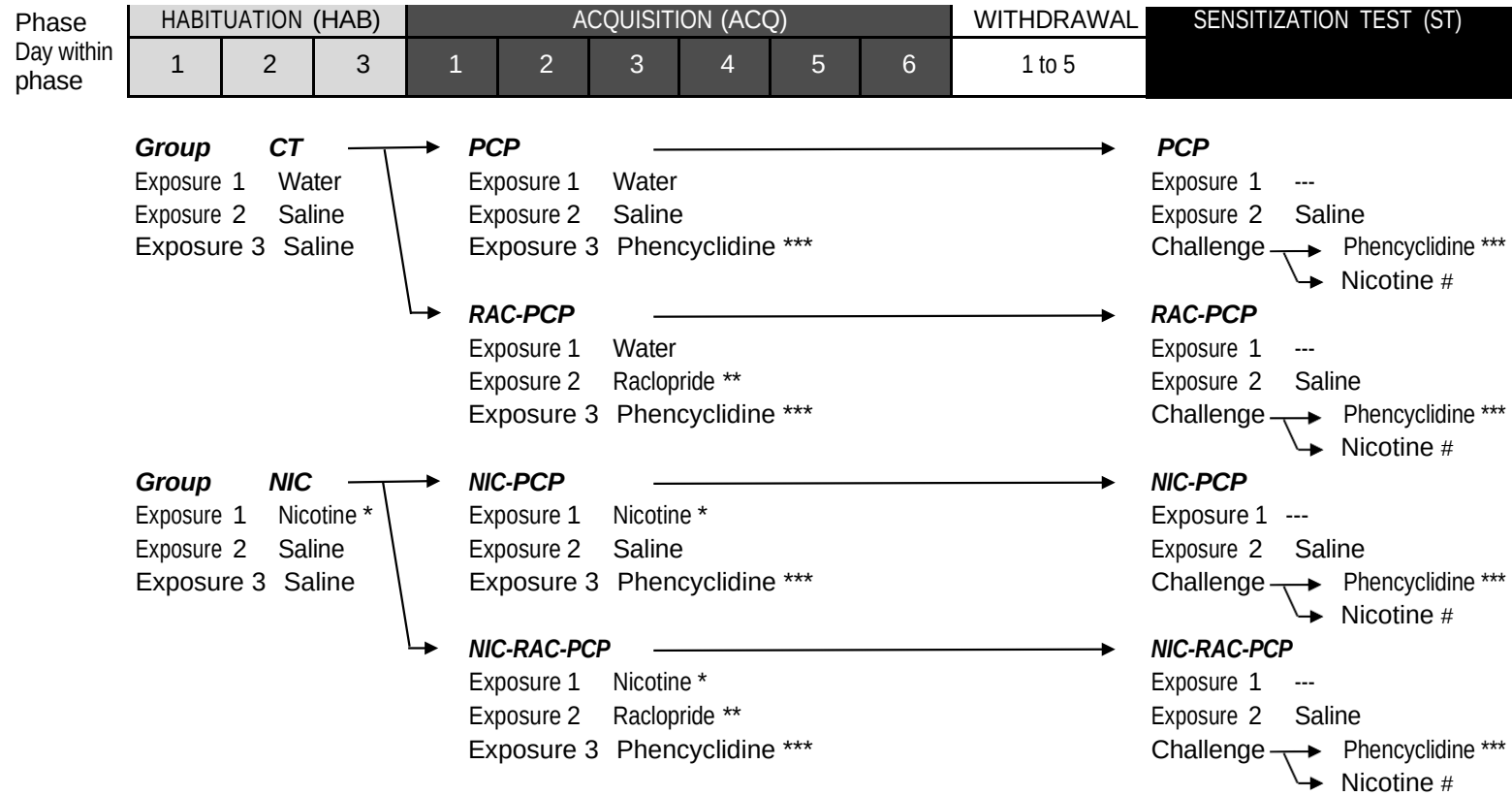


Figure 2

[Click here to access/download;Figure\(s\);Dutra-Tavares et al 2022 Fig 2.pptx](#) **Figure 2**

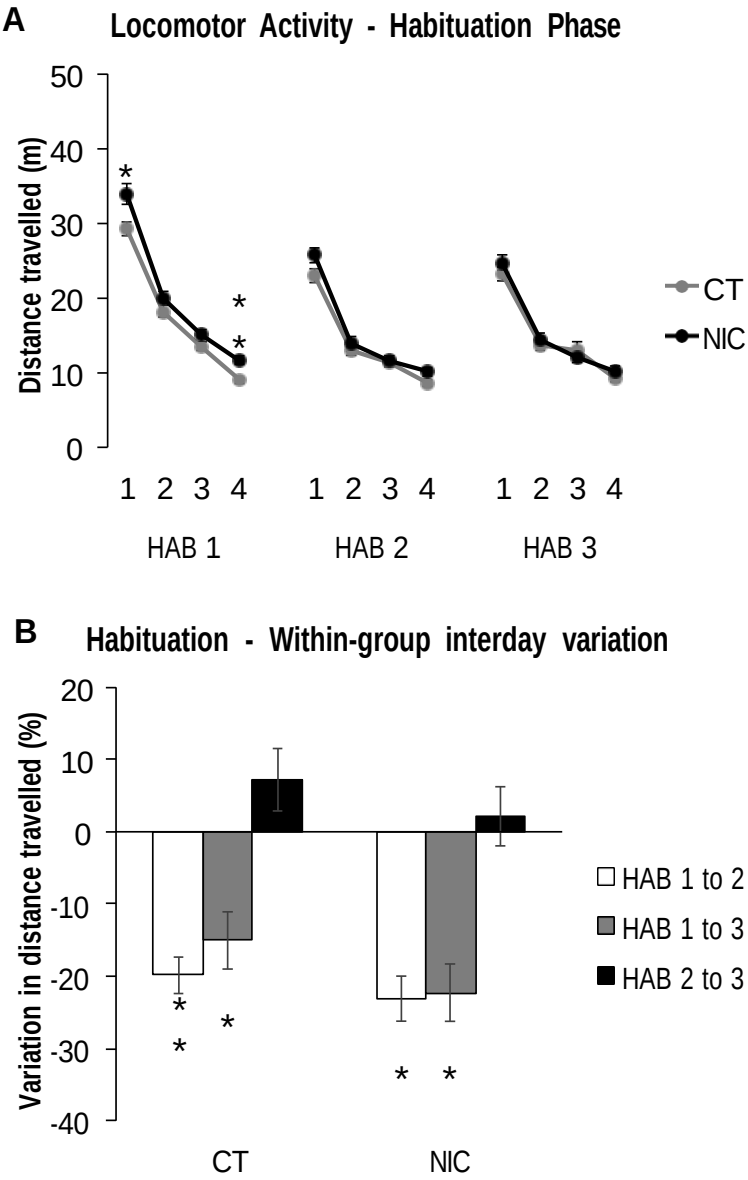
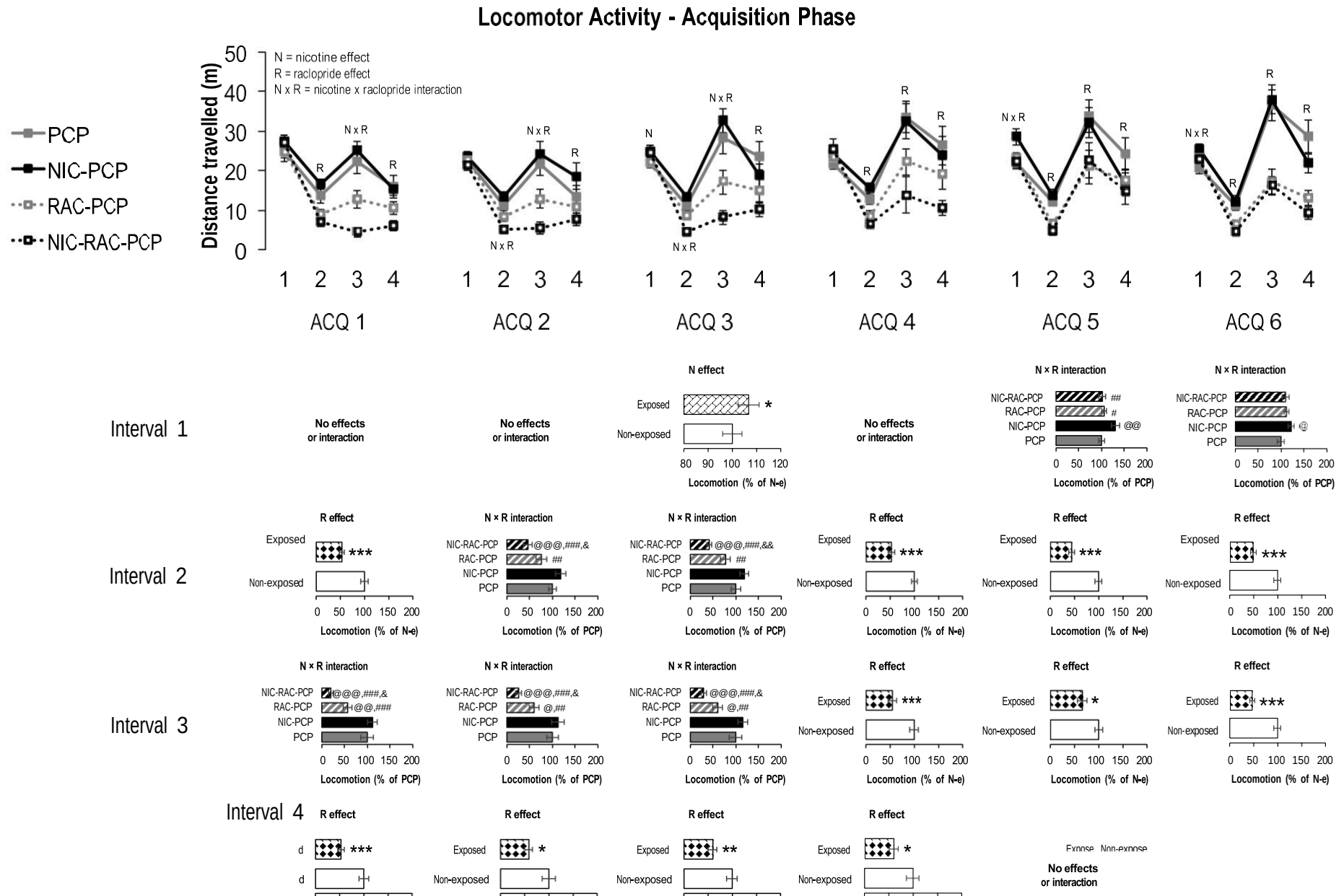
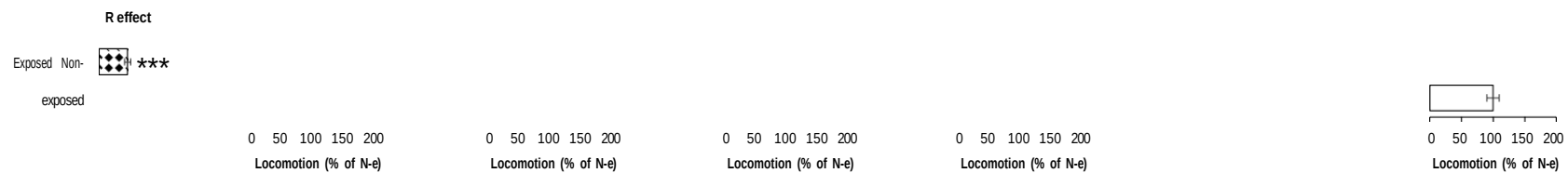
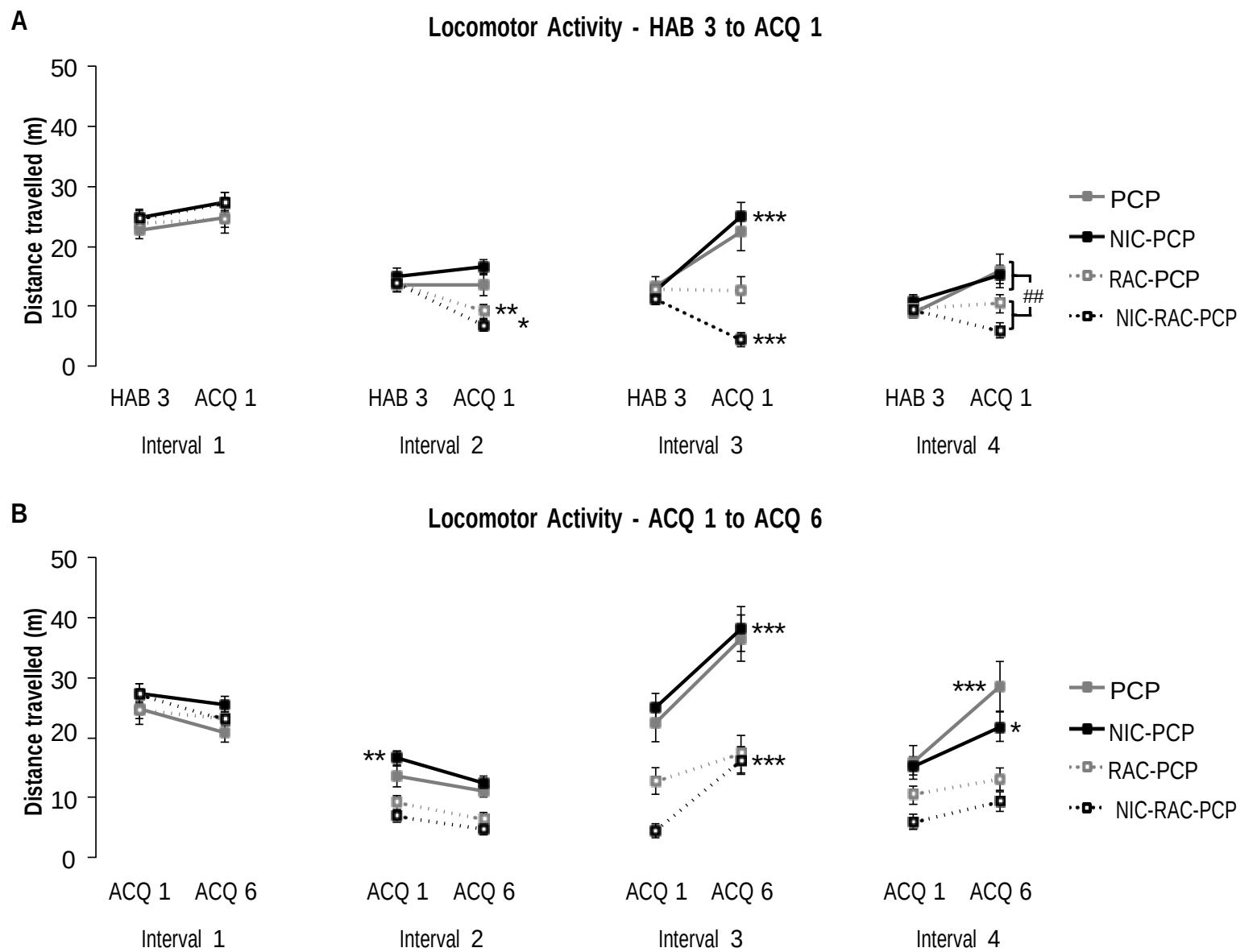
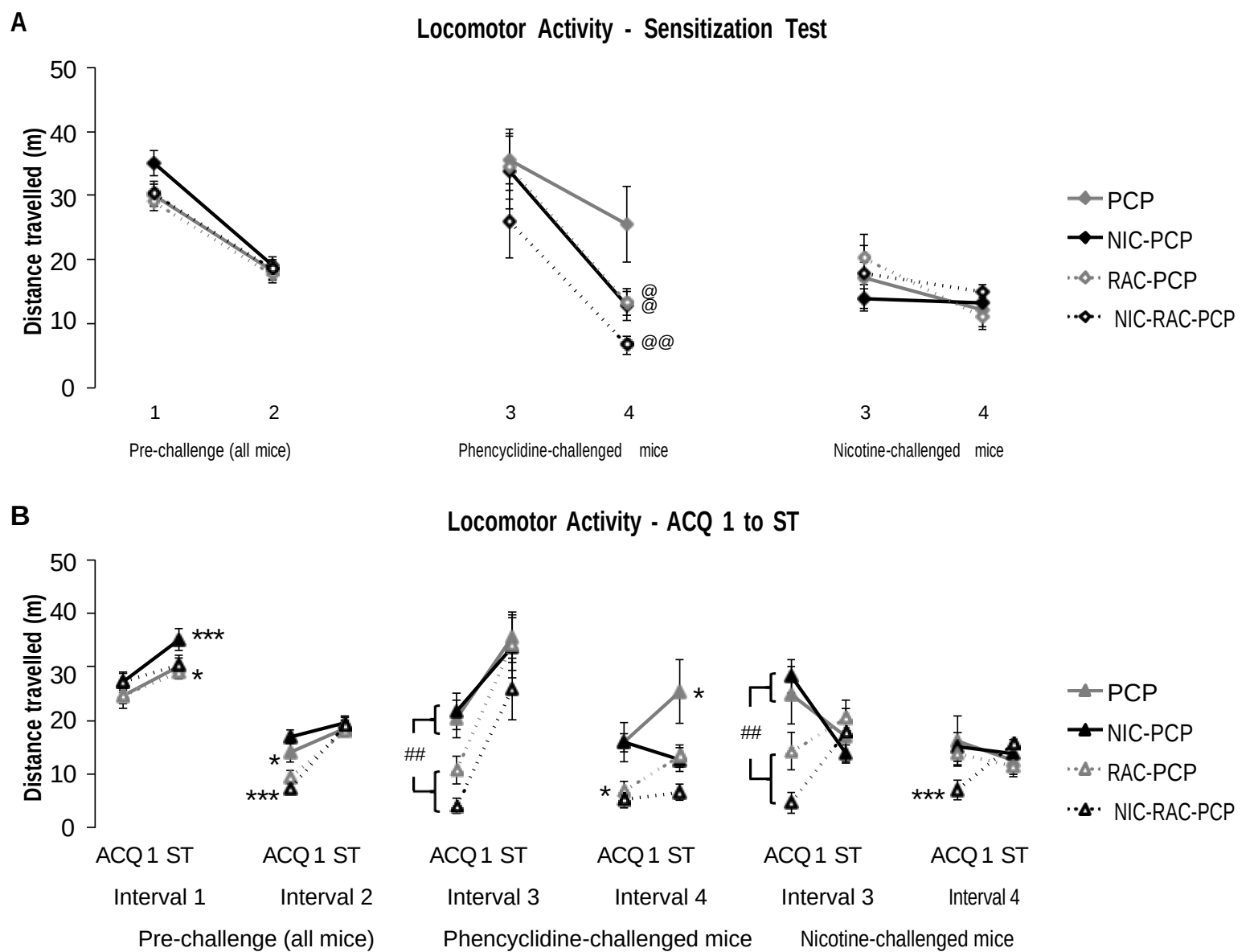


Figure 3.3











[Click here to access/download](#)

Supplementary Material

[Dutra-Tavares et al 2022 SM - Tables.docx](#)



AUTHORS CONTRIBUTIONS

Ana Carolina Dutra-Tavares: Conceptualization, Methodology, Writing- Reviewing and Editing, Investigation, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Anais Bandeira-Martins: Methodology, Validation, Investigation, Project administration, Writing-Reviewing and Editing, Visualization.

Juliana O. Silva: Methodology, Investigation, Validation, Writing-Reviewing and Editing, Visualization.

Luciana Alves Couto: Writing- Reviewing and Editing, Project administration, Investigation.

Claudio C. Filgueiras: Conceptualization, Validation, Resources, Writing-Reviewing and Editing.

Anderson Ribeiro-Carvalho: Conceptualization, Data curation, Writing-Reviewing and Editing.

Alex C. Manhães: Conceptualization, Formal Analysis, Data curation, Writing-Reviewing and Editing.

Yael Abreu-Villaça: Conceptualization, Methodology, Formal Analysis, Writing-Original draft preparation, Supervision, Project administration, Funding acquisition.