

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

SENSIBILIZAÇÃO COMPORTAMENTAL CRUZADA
ENTRE ANFETAMINA E NICOTINA INDUZIDA NA
ADOLESCÊNCIA PERSISTE ATÉ A IDADE ADULTA

GABRIELA CRISTINA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

SÃO CARLOS – SP
2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S237sc

Santos, Gabriela Cristina dos.

Sensibilização comportamental cruzada entre anfetamina e nicotina induzida na adolescência persiste até a idade adulta / Gabriela Cristina dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2005.
75 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Medicina experimental - rato. 2. Nicotina. 3. Sensibilização comportamental. 4. Anfetamina. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais Daniel dos Santos e Mércia Aparecida dos Santos.

Amados pais, obrigada por me ensinarem sempre que o maior presente que Deus nos deu é a vida. Obrigada por me apontarem o caminho do bem, do amor e respeito ao próximo. Vocês sempre me mostraram que o conhecimento é o mais valioso bem que podemos ter, o único que ninguém pode nos tomar e que através dele buscamos nossa realização e o trabalho em benefício aos nossos semelhantes.

Tenho em vocês meus exemplos de confiança, força, coragem, determinação e luta. Vocês me mostram a cada dia que não podemos desistir de caminhar frente aos obstáculos, mas que eles surgem em nossas vidas para podermos atravessá-los e nos tornar pessoas mais fortes, mais unidas, mais confiantes na perfeição de Deus.

Obrigada pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, pelo incentivo nas horas difíceis, pela compreensão da distância. Obrigada pelas tantas vezes que sacrificaram seus sonhos em favor dos meus.

Vocês estão e sempre estarão em meu coração e meus pensamentos. Cada vitória que eu alcançar em minha vida será o reflexo do amor que vocês tem por mim, será uma conquista atingida por vocês. Tenho orgulho de ser filha de pessoas tão especiais.

MUITO OBRIGADA, AMO VOCÊS!!!!!!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela oportunidade de crescimento e aprendizado espiritual. Pela constante proteção e amparo, especialmente nos momentos mais difíceis.

À **Prof.^a Dr.^a Cleópatra da Silva Planeta**, pela dedicada e preciosa orientação. Exemplo de que competência, profissionalismo e ensino podem estar aliados à amizade e ao respeito pelo outro. Obrigada pela oportunidade e contribuição no meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus irmãos **Glauco e Camila** por me mostrarem a importância da amizade e união na família. Obrigada pelo incentivo e dedicação de vocês em todos os momentos da minha vida. Vocês são realmente os irmãos que eu gostaria de ter.

À minha avó **Odete** pelo exemplo de força, dedicação e amor aos filhos, netos e bisnetos.

Aos meus avós **José e Sebastiana** (*in memoriam*) pela dedicação não só a mim, mas à família inteira sempre.

Aos meus sobrinhos, **Gabriel, Vitória, Vinícius, Valéria e Ismael**, pela alegria e luz que a presença de vocês traz para nossa família.

À **toda a minha família** que está sempre presente, me incentivando e me apoiando em todos os momentos da minha vida. Ter pessoas especiais como vocês em um laço afetivo tão próximo é um presente de Deus.

Aos Profs. **Maria do Carmo Longo, José Francisco Fracasso** e **Ricardo Luiz Nunes de Souza**, pelo apoio e incentivo e também por tornarem o laboratório um ambiente agradável e de amizades.

À **Elisabete Z. P. Lepera e Rosana F. P. Silva**, pela amizade, paciência e auxílio fundamental no desenvolvimento do trabalho e pela organização e zelo dedicados ao laboratório.

Ao Prof. **Roberto DeLucia** pelo apoio de sempre e pelas substâncias psicoativas que viabilizaram a execução do trabalho

Ao **José Nelson**, pessoa especial que me incentivou e me apoiou com carinho e dedicação nos momentos difíceis e de dúvidas que surgiam nessa caminhada.

Às amigas e companheiras **Mari e Chris**, pela amizade, convivência fraterna e por dividir não só nossa casa, mas também nossas alegrias e tristezas na realização desse trabalho.

À amiga **Karina** que mostrou que amizade verdadeira não leva em conta o tempo de convivência.

Aos amigos do laboratório **Fábio, Carolina, Alessandra, Marcelo, Camila, Ana Helena, Roberta, Rodrigo, Vander, Ana Paula, Alianda, Tarciso, Karina, Eduardo, Joyce, Kátia, Julise e a todos os outros**, pela amizade e apoio, fundamental para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos Profs. e amigos **João Aristeu da Rosa e Márcia da Silva**, por serem exemplos de profissionais e pessoas, fundamentais na minha formação.

Aos Profs. da **Banca examinadora** pela valiosa contribuição a esse trabalho

Aos **funcionários do biotério** pela dedicação no cuidado com os animais utilizados nesse trabalho e atenção nos momentos de necessidade.

Ao grupo **PET-Farmácia UNESP e todos os petianos**, pela formação extracurricular e por me proporcionar na prática o ensino, a pesquisa e a extensão ainda na graduação, iniciando meu interesse pela pós-graduação.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**, pelo convênio da Universidade Federal de São Carlos e da Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade.

À secretária do PPG-CF, **Selma**, pela paciência e disponibilidade de apoio.

A **todos**, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	1
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. Dependência a substâncias psicoativas	5
1.2. Substâncias psicoativas	8
<i>1.2.1. Anfetamina</i>	8
<i>1.2.2. Nicotina</i>	10
1.3. Interação entre psicostimulantes e nicotina	11
1.4. Nicotina, psicostimulantes e adolescência	15
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Animais	20
3.2. Avaliação da atividade locomotora	21
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
4.1. Sensibilização comportamental	22
<i>4.1.1. Sensibilização comportamental à nicotina em animais adolescentes</i>	22
<i>4.1.2. Sensibilização comportamental à anfetamina em animais adolescentes</i>	22
4.2. Sensibilização Cruzada	23
<i>4.2.1. Pré-tratamentos</i>	23
<i>4.2.2. Locomoção induzida pela nicotina em animais adolescentes pré-tratados com anfetamina</i>	23

4.2.3. <i>Locomoção induzida pela anfetamina em animais adolescentes pré-tratados com nicotina</i>	24
4.2.4. <i>Locomoção induzida pela nicotina em animais adultos tratados com anfetamina na adolescência</i>	24
4.2.5. <i>Locomoção induzida pela anfetamina em animais adultos tratados com nicotina na adolescência</i>	25
4.3. Análise estatística	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1 – Sensibilização comportamental	26
5.1.1. <i>Sensibilização comportamental à nicotina em animais adolescentes</i>	26
5.1.2. <i>Sensibilização comportamental à anfetamina em animais adolescentes</i>	27
5.2 – Sensibilização cruzada	29
5.2.1. <i>Locomoção induzida pela nicotina em animais adolescentes pré-tratados com anfetamina</i>	29
5.2.2 <i>Locomoção induzida pela anfetamina em animais adolescentes pré-tratados com nicotina</i>	32
5.2.3. <i>Locomoção induzida pela nicotina em animais adultos pré-tratados com anfetamina na adolescência</i>	36
5.2.4. <i>Locomoção induzida pela anfetamina em animais adultos pré-tratados com nicotina na adolescência</i>	37
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÕES.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
9. ANEXO – ESTATÍSTICA COMPLETA	70

LISTA DE FIGURA

Figura 1- Caixa de determinação da atividade locomotora.....21

Figura 2 – Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou nicotina 0,4 mg/kg em ratos adolescentes 3 dias após a interrupção do tratamento com nicotina (0,4 mg/kg, s.c.) ou salina durante 7 dias consecutivos.....27

Figura 3 - Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou anfetamina 1,0 mg/kg em ratos adolescentes 3 dias após a interrupção do tratamento com anfetamina (5,0 mg/kg, i.p.) ou salina durante 7 dias consecutivos.....29

Figura 4 – Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou nicotina 0,4 mg/kg em ratos adolescentes 3 e 10 dias após a interrupção do tratamento com anfetamina (5,0 mg/kg, i.p.) ou salina durante 7 dias consecutivos.....31

Figura 5 A - Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou anfetamina nas doses de 5,0; 2,5 e 1,0 mg/kg em ratos adolescentes 3 dias após a interrupção do tratamento com nicotina (0,4 mg/kg, s.c.) ou salina durante 7 dias consecutivos.....34

Figura 5 B – Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou anfetamina nas doses de 5,0; 2,5 e 1,0 mg/kg em ratos adolescentes 10 dias após a interrupção do tratamento com nicotina (0,4 mg/kg, s.c.) ou salina durante 7 dias consecutivos.....35

Figura 6- Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou nicotina (0,4 mg/kg, s.c.) em ratos adultos 36 dias após a interrupção do tratamento com anfetamina (5,0 mg/kg, i.p.) ou salina durante 7 dias consecutivos na adolescência.....37

Figura 7 – Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou anfetamina nas doses de 5,0; 2,5 e 1,0 mg/kg em ratos adultos 36 dias após a interrupção do tratamento com nicotina (0,4 mg/kg, s.c.) ou salina durante 7 dias consecutivos na adolescência.....40

RESUMO

A sensibilização comportamental é caracterizada pelo aumento progressivo e duradouro da atividade locomotora induzida pelos psicostimulantes e outras substâncias de abuso, decorrente da administração repetida dessas substâncias. Esse fenômeno tem sido extensivamente estudado em animais experimentais e tem sido implicada como um componente fundamental na dependência a substâncias psicoativas. Nicotina e psicostimulantes são sempre utilizados em combinação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilização cruzada entre nicotina e anfetamina em ratos expostos ao tratamento repetido com essas substâncias na adolescência. Nós avaliamos o efeito do tratamento com nicotina (0,4 mg/kg; s.c.) ou anfetamina (5 mg/kg, i.p.) do dia pós natal (P) 28-34 sobre os efeitos na atividade locomotora induzida pela anfetamina (1,0; 2,5; 5,0 mg/kg, i.p.) ou nicotina 3 (P37) e 10 (P44) dias após o término do tratamento. Além disso, os efeitos da anfetamina ou nicotina foram avaliados 36 dias (P70) após os tratamentos com nicotina ou anfetamina para determinar se os efeitos da exposição da exposição às substâncias na adolescência persistiam até a idade adulta. Os animais adolescentes pré-tratados com anfetamina foram sensibilizados aos efeitos sobre a atividade locomotora induzidos pela nicotina. Além disso, o pré-tratamento com nicotina na adolescência aumentou a atividade locomotora induzida por 5,0 mg/Kg de anfetamina. Apesar de ratos adultos serem menos sensíveis à nicotina, essa substância aumentou significativamente a atividade locomotora em ratos adultos pré-tratados com anfetamina na adolescência. E ainda, em ratos adultos, o pré-tratamento com nicotina na adolescência aumentou a atividade locomotora induzida por 1,0 mg/Kg de anfetamina. Esses resultados sugerem a sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina em ratos adolescentes. Além disso, que a sensibilização é duradoura e persiste até a idade adulta.

ABSTRACT

Behavioral sensitization is a progressive and enduring enhancement of the motor stimulant effects of psychostimulants and other drugs of abuse, elicited by repeated administration of these drugs. This phenomenon has been extensively studied in experimental animals and has been implicated as a key component in drug addiction. Nicotine and psychostimulants are often abused in combination. The aim of the present study was to examine the cross-sensitization between nicotine and amphetamine in rats exposed to repeated treatment with the drugs during adolescence. We evaluated the effects of the treatment with nicotine (0.4 mg/kg; s.c.) or amphetamine (5.0 mg/kg, i.p.) from postnatal day (P) 28 – P34 on amphetamine- (1.0, 2.5, 5.0 mg/kg, i.p.) or nicotine – induced locomotor activity 3 (P37) or 10 days (P44) after drug treatment ended. Further, the effects of amphetamine or nicotine were examined 36 days (P70) after nicotine or amphetamine treatments to determine whether the effects of drug exposure during periadolescence persisted into adulthood. Adolescent animals pretreated with amphetamine were sensitized to the locomotor-activating effects of nicotine. Moreover, the pretreatment with nicotine during adolescence increased locomotor activity induced by 5.0 mg/kg of amphetamine. Although adult rats are less sensitive to nicotine, this drug significantly increased the locomotor activity in adult rats that were pretreated with amphetamine during adolescence. In addition, in adult rats, the pretreatment with nicotine during adolescence increased locomotor activity induced by 1.0 mg/kg of amphetamine. These data suggest the cross-sensitization between amphetamine and nicotine in adolescent rats. Moreover, the sensitization is long-lasting and persists until adulthood.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Dependência a substâncias psicoativas

Atualmente, a dependência às substâncias psicoativas é conceituada como uma síndrome comportamental na qual o uso da substância adquire prioridade na vida do indivíduo. De acordo com esse conceito, a dependência é caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas indicativos de que o indivíduo perdeu o controle do uso da substância e o mantém a despeito das suas conseqüências adversas, segundo o DSM-IV (Nestler, 2001).

Nos primeiros estudos sistemáticos com o objetivo de compreender a farmacodependência, predominaram as investigações das conseqüências aversivas decorrentes da interrupção do uso das substâncias psicoativas, quadro denominado de síndrome de abstinência (Jaffe, 1990).

A síndrome de abstinência é um conjunto de sinais e sintomas, geralmente opostos aos efeitos agudos das substâncias psicoativas, que causam desconforto intenso ao indivíduo, caracterizando assim, a dependência física (O'Brien, 2001). Assim, foi proposto que indivíduos que desenvolvessem a dependência física manteriam o uso da substância para evitar o desconforto da retirada e dessa forma a substância atuaria como um reforçador negativo (O'Brien, 2001). Embora todas as substâncias psicoativas que produzem dependência induzam a síndrome de abstinência, os sinais e sintomas, com exceção da fissura, são específicos para cada substância (ou classe de substância) e, portanto devem ser mediados pela neuroadaptação de sistemas neurais distintos.

As pesquisas recentes têm se concentrado na busca dos elementos comuns subjacentes ao desenvolvimento da dependência às diferentes substâncias psicoativas. Dessa forma, o conhecimento relativo a uma substância poderia ser estendido às outras, elaborando-se, assim, uma teoria geral para explicar esse fenômeno.

Dessa maneira, sugere-se que todas as substâncias psicoativas que induzem dependência são reforçadores positivos, isto é, têm em comum a propriedade de causar efeitos euforizantes ou prazerosos (Wise & Bozarth, 1987). O efeito reforçador positivo das substâncias psicoativas é decorrente da ativação aguda de um substrato neurobiológico comum – o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Os principais componentes do circuito do reforço são a área tegmental ventral (sítio de corpos celulares de neurônios dopaminérgicos) e suas projeções para regiões do sistema límbico incluindo o núcleo accumbens, o tubérculo olfativo, a amígdala e o córtex frontal e límbico (Koob, 1992; Koob & Le Moal, 2001).

O efeito reforçador positivo, ou seja, a sensação de prazer causada pela substância psicoativa, explica a experimentação e o seu uso ocasional. Entretanto, o desenvolvimento da dependência parece ser um fenômeno mais complexo que resulta da interação entre a substância psicoativa, o indivíduo e o ambiente (O'Brien, 2001). Além disso, essa teoria não explica as principais características da dependência como ela é conceituada atualmente: a perda do controle do uso da substância e seu uso a despeito das conseqüências adversas (World Health Organization, 1992; O'Brien, 2001).

Robinson & Berridge (1993) propuseram uma nova teoria, segundo a qual o uso compulsivo das substâncias psicoativas resultaria de processos

neuroadaptativos causados pelo uso repetido das mesmas. É amplamente conhecido o fato de que os efeitos das substâncias psicoativas se modificam no decorrer do uso prolongado. Essas alterações expressam-se como tolerância ou sensibilização comportamental.

A sensibilização comportamental caracteriza-se pelo aumento gradual e progressivo da atividade locomotora observado após a administração repetida da substância, e é um fenômeno comum a todas as substâncias psicoativas que produzam dependência (Post & Contel, 1983; Robinson & Becker, 1986). A sensibilização comportamental foi descrita para a cocaína (Miserendino & Nestler, 1995), anfetamina (Robinson & Becker, 1986; Aizenstein et al., 1990; Vezina & Queen, 2000); morfina (Kalivas & Duffy, 1987; Powel & Holtzman, 2001); etanol (Phillips et al., 1997), nicotina (Domino, 2001; Shim et al., 2001) e delta-9-THC (Cadoni et al., 2001).

A sensibilização comportamental resulta de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico (Robinson & Becker, 1986; Nestler et al., 2001), contudo, segundo Robinson & Berridge (1993) a sensibilização não resultaria no aumento do efeito reforçador das substâncias psicoativas, mas da saliência motivacional do estímulo.

De acordo com Robinson & Berridge (1993; 2000; 2001) ao invés de mediar apenas a sensação subjetiva de prazer, a dopamina regularia o impulso motivacional e a atenção a estímulos salientes, incluindo os estímulos reforçadores.

Segundo Robinson & Berridge (1993; 2000; 2001), as substâncias psicoativas produziriam sensibilização do sistema dopaminérgico e isto tornaria os estímulos (uso da substância e comportamentos relacionados) altamente

salientes, atrativos e desejados. Assim, com o uso repetido, as substâncias psicoativas e os estímulos associados tornam-se progressivamente mais atrativos e capazes de controlar o comportamento. Com o uso prolongado, o “querer” evolui para o desejo obsessivo que se manifesta pelo comportamento de compulsão pela substância psicoativa.

Recentemente, Covington e Miczek (2001), utilizaram o modelo de auto-administração com acesso contínuo (FR1) à substância por 24 horas (“binge”), para avaliar a relação entre sensibilização comportamental e a perda do controle do uso de cocaína, compatibilizando, assim, o paradigma experimental com o conceito atual de dependência e a teoria proposta por Robinson & Berridge (1993).

1.2 – Substâncias psicoativas

1.2.1. Anfetamina

A anfetamina (β -fenilisopropilamina), um fármaco sintético, tem estrutura química da feniletilamina substituída com um grupo CH_3 no carbono α (Goodman & Gilman, 2001). Suas propriedades psicostimulantes foram descritas no início do século XX por Gordon Alles, que pesquisava um substituto mais potente para o descongestionante nasal efedrina. Alles verificou que quando inalada ou administrada por via oral, a anfetamina reduzia drasticamente a fadiga, aumentava o alerta e causava sensação de euforia. A anfetamina tornou-se disponível nos Estados Unidos em 1932 como um medicamento sem necessidade de prescrição médica. Sua indicação terapêutica inicial foi como descongestionante nasal, porém logo foram descritos relatos do uso abusivo

devido a suas propriedades estimulantes (Hanson et al., 2004). Devido à ausência de restrições, os produtos anfetamínicos eram utilizados para o tratamento de várias patologias como obesidade, alcoolismo, depressão e esquizofrenia (Hanson et al., 2004). Nos Estados Unidos, a partir de 1965 essas substâncias passaram a ter um controle mais rigoroso e a legislação de 1970 começou a regular a fabricação e distribuição de anfetamínicos e outras substâncias (Luna, 2001).

O uso epidêmico de prescrições de produtos anorexígenos anfetamínicos no final dos anos 60 revelou o potencial de dependência da anfetamina (Hanson et al., 2004). O abuso de estimulantes como a anfetamina ocorre em vários segmentos da população, incluindo atletas, motoristas de caminhão, estudantes e pessoas que querem perder peso rapidamente. Mas, nos Estados Unidos, o uso predominante ocorre entre adolescentes e jovens de classe média (Luna, 2001). Ainda nos Estados Unidos, o abuso de anfetamínicos tem aumentado nos últimos anos tanto em áreas urbanas, como suburbanas e rurais, onde o uso dessas substâncias psicoativas não era tão difundido. Esse aumento tem sido observado inclusive em populações hispânicas especialmente na fronteira com o México (Community Epidemiology Work Group, 2004).

No Brasil, o uso de anfetamínicos entre os estudantes de ensino fundamental e médio está entre os fármacos psicotrópicos que apresentaram aumento significativo no consumo comparando-se levantamentos realizados nos anos de 1987 a 1997 (CEBRID, 1997). O abuso parece ocorrer também no segmento de trabalhadores de diferentes empresas brasileiras. Nesse sentido Silva & Yonamine (2004) detectaram a presença de anfetamina em 14, 6% das

amostras de urina positivas para substâncias psicoativas provenientes das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Os autores pesquisaram maconha, cocaína, anfetamina e associações, em amostras das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste.

1.2.2. Nicotina

A fumaça do cigarro contém mais de 4.000 substâncias químicas. Contudo, a maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos demonstra que a nicotina é o principal agente responsável pelo desenvolvimento da dependência ao tabaco (Stolerman & Jarvis, 1995). A nicotina é um dos poucos alcalóides naturais líquidos. É incolor, uma base volátil que se torna marrom e adquire o odor de tabaco na exposição ao ar (Goodman & Gilman, 2001).

O uso do tabaco surgiu aproximadamente no ano 1000 a.C., nas sociedades indígenas da América Central, em rituais mágicos-religiosos. A planta, cientificamente chamada *Nicotiana tabacum*, chegou ao Brasil provavelmente pela migração de tribos tupis-guaranis. Quando os portugueses aqui desembarcaram, tomaram conhecimento do tabaco pelo contato com os índios (Instituto Nacional do Câncer, 2005).

A partir do século XVI, o seu uso disseminou-se pela Europa, introduzido por Jean Nicot, diplomata francês vindo de Portugal. No final do século XIX, iniciou-se a industrialização do tabaco sob a forma de cigarro. A partir de meados do século XX, com o desenvolvimento de técnicas avançadas de publicidade e marketing, o uso do tabaco disseminou-se por todo o mundo. A partir da década

de 1960, surgiram os primeiros relatórios médicos que relacionavam o cigarro ao adoecimento do fumante e, a seguir, ao do não-fumante (fumante passivo) (Instituto Nacional do Câncer, 2005).

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável em todo o mundo. A OMS estima que um terço da população mundial adulta, isto é, um bilhão e duzentos milhões de pessoas sejam fumantes (Instituto Nacional do Câncer, 2005).

No Brasil um terço da população adulta é fumante, sendo 11,2 milhões de mulheres e 16,7 milhões de homens. A maioria dos fumantes tem entre 20 e 49 anos de idade (Instituto Nacional do Câncer, 2005). Além das conseqüências conhecidas do tabagismo como derrames, câncer de pulmão, doenças coronarianas, a lista de malefícios causados pelo tabaco tem aumentado com a inclusão de aneurisma aórtico abdominal, leucemia mielóide aguda, catarata, câncer cervical, renal, estomacal e pancreático, pneumonia e periodontite (CDC, 2005).

1.3 - Interação entre psicostimulantes e nicotina

Os fármacos estimulantes psicomotores são classificados como agentes dopaminérgicos de ação indireta. O mecanismo crítico pelo qual os psicostimulantes exercem seus efeitos é o aumento da transmissão dopaminérgica.

A cocaína bloqueia a proteína transportadora de dopamina, inibindo assim a recaptação do neurotransmissor. A anfetamina tem ações mais complexas no terminal dopaminérgico pré-sináptico, mas sua ação mais significativa é a ligação

à proteína transportadora e a indução do transporte reverso de dopamina (Hyman, 1996).

O resultado final das ações dos psicostimulantes nos terminais dopaminérgicos é o aumento da concentração de dopamina na fenda sináptica. A dopamina acumulada na fenda interage com seus receptores iniciando uma seqüência de eventos que modifica a atividade neural e finalmente a expressão do comportamento.

O metilfenidato, dietilpropiona e femproporex são derivados anfetaminícos utilizados na terapêutica. Os principais efeitos desses fármacos estão relacionados às suas ações no sistema nervoso central que resultam em alerta, diminuição do senso de fadiga, elevação do humor, aumento da iniciativa, da auto-confiança, da capacidade de concentração, da fala e da atividade motora. Essas substâncias produzem euforia e apresentam potencial de abuso e dependência.

Estudos pré-clínicos demonstram que, de forma semelhante à anfetamina, metilfenidato, femproporex induzem preferência condicionada por lugar, auto-administração e sensibilização comportamental (Shuster et al, 1982; Bergman et al., 1989; Gaytan et al., 1997; Planeta & DeLucia, 1998; Meririinne et al, 2001; Alcantara et al., 2002).

A nicotina é um agonista dos receptores colinérgicos nicotínicos. No sistema nervoso central os receptores nicotínicos são pentâmeros compostos por diferentes combinações das cadeias polipeptídicas α e β . As cinco subunidades estão dispostas na membrana celular de tal forma a circundar um canal iônico. A ligação da nicotina a esses receptores provoca alterações conformacionais e

conseqüente abertura do canal, permitindo o influxo de cátions (Na^+ e Ca^{2+}), resultando geralmente, em despolarização do neurônio (Torrão et al., 2002).

De forma semelhante às outras substâncias psicoativas a nicotina também induz sensibilização comportamental em animais adultos (Domino, 2001; Shim et al., 2001; Cruz et al., 2005). Finalmente o papel do sistema mesolímbico no abuso de nicotina é confirmado pelo fato de que antagonistas dopaminérgicos ou lesões do núcleo acumbens reduzem a sua auto-administração (Corrigal et al, 1992).

Foi demonstrado ainda que a nicotina estimula a liberação de dopamina no núcleo acumbens tanto *in vitro* como *in vivo* (Pontiere et al, 1996). Estudos utilizando autoradiografia ou hibridização *in situ* indicam a presença das subunidades α e β dos receptores nicotínicos localizados nos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral e nos terminais no núcleo acumbens (Marks et al., 1992; McGehee & Role, 1995). A administração intermitente de nicotina, ou agonistas nicotínicos aumenta a taxa de disparos dos neurônios da área tegmental ventral (Calabresi et al., 1989).

Os psicostimulantes também podem modificar a transmissão colinérgica. Nesse sentido, Bickerdike & Abercrombie (1997) demonstraram que a administração aguda de psicostimulantes aumenta a liberação de acetilcolina no núcleo acumbens e a administração repetida aumenta a taxa de disparo dos neurônios colinérgicos. Além disso, a administração de diidro - β - eritroidina, antagonista de receptores nicotínicos bloqueia o desenvolvimento de sensibilização comportamental pela anfetamina (Schoffelmeer et al., 2002).

Assim, os psicostimulantes e a nicotina podem interagir no sistema mesocorticolímbico nos processos que levam ao desenvolvimento da

sensibilização comportamental de tal forma que a exposição à nicotina pode modificar a vulnerabilidade aos psicostimulantes e vice-versa. De fato, foi demonstrada, em animais adultos, a ocorrência de sensibilização cruzada entre nicotina e psicostimulantes (Smith et al, 1999).

Há evidências de que a sensibilização comportamental seja duradoura. Neste sentido, Vanderschuren et al. (1999) demonstraram que uma única administração de anfetamina tem efeito duradouro, evidenciando a sensibilização à própria anfetamina e sensibilização cruzada à cocaína até 3 semanas após à primeira injeção aguda da droga. A sensibilização à cocaína também é duradoura. Em um estudo, Ciccocioppo et al. (2004) mostraram que o estímulo ambiental associado a uma única experiência de auto-administração de cocaína induz a uma forte busca pela substância que persiste por até um ano.

Muitos trabalhos investigam o fenômeno da sensibilização comportamental e seus mecanismos neurais em animais adultos. Contudo, comparativamente poucos estudos foram realizados para avaliar a sensibilização em modelos animais de adolescência, embora estudos nesses modelos sejam fundamentais para a compreensão da vulnerabilidade de adolescentes humanos ao uso de substâncias psicoativas. Outro aspecto importante é o fato de que a sensibilização comportamental é duradoura, e dessa forma a exposição a substâncias psicoativas durante a adolescência pode ter conseqüências em estágios posteriores da ontogenia até a idade adulta.

De fato, Carlezon & Konradi (2004) mostraram que ratos expostos ao metilfenidato na adolescência apresentaram sensibilização duradoura e alterações moleculares consistentes com mudanças profundas nas funções de recompensa neurais na idade adulta.

1.4 - Nicotina, psicostimulantes e adolescência

O abuso de substâncias psicoativas entre humanos geralmente tem início na adolescência, um período da ontogenia em que os indivíduos exibem características comportamentais idade-específicas, como comportamento de risco e busca por novidades, que pode predispor ao início do uso de substâncias psicoativas (Spear, 2000).

Em ratos, o período da adolescência, conhecido como “periadolescência” ocorre aproximadamente entre os dias pós-natal (P) 28 a 42 (Spear, 2000). Nesse período, observam-se mudanças neurais consideráveis no sistema nervoso central do rato. Há super-expressão de receptores dopaminérgicos estriatais (Teicher et al., 1995; Bolanos et al., 1998) e aumento na liberação de dopamina no córtex pré-frontal (Rosenberg & Lewis, 1995). Além disso, os níveis de transportadores de dopamina (Coulter et al., 1996), receptores de dopamina (Schambra et al., 1994), transportadores de serotonina (Moll et al., 2000) e receptores de nicotina (Fiedler et al., 1990) nesse período vão se aproximando dos níveis encontrados em animais adultos. Essas mudanças neurais podem levar a respostas comportamentais características da adolescência.

Os efeitos dos fármacos também são diferentes em adultos e adolescentes. Assim, embora poucos estudos tenham sido realizados em modelos animais de adolescência, há evidências que eles respondem à nicotina diferentemente de adultos. Por exemplo, ratos adolescentes parecem ser mais sensíveis aos efeitos reforçadores da nicotina como evidenciado por preferência condicionada por lugar (Vastola et al., 2002). Avaliando-se a atividade locomotora em resposta à nicotina, foi verificado que ratos adolescentes foram mais sensíveis aos efeitos iniciais na nicotina do que animais adultos (Faraday et al., 2001;

Collins & Izenwasser, 2004), mas não desenvolveram sensibilização comportamental durante sete dias de tratamento com a substância psicoativa (Collins & Izenwasser, 2004). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados em nosso laboratório (Cruz et al., 2005). Além das diferenças comportamentais, ratos adolescentes também apresentam adaptações neuroquímicas em resposta à nicotina diferentes dos animais adultos. Por exemplo, Collins et al. (2004a) mostraram que o tratamento repetido com nicotina aumenta a densidade de transportadores de dopamina e diminui a densidade de transportadores de serotonina em ratos adolescentes. Não ocorrem alterações na densidade de receptores colinérgicos nicotínicos ou receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ nesses animais. Em animais adultos, há o aumento na densidade de receptores colinérgicos nicotínicos, mas nenhuma alteração nas densidades de transportadores de dopamina, receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ ou transportadores de serotonina.

Ratos adolescentes e adultos também mostram diferenças em resposta aos psicostimulantes. Nesse sentido, foi mostrado que ratos adolescentes são menos sensíveis aos efeitos agudos da cocaína na atividade locomotora (Bolanos et al., 1998; Laviola et al., 1999; Adriani & Laviola, 2000). Contudo, ratos adolescentes repetidamente tratados com cocaína mostraram aumento significativo na locomoção após uma dose desafio dessa substância psicoativa (Laviola et al., 1995; Planeta & Marin, 2002), sugerindo o desenvolvimento de sensibilização comportamental.

De forma semelhante ao observado para a cocaína, ratos periadolescentes e adultos tem respostas comportamentais diferentes à anfetamina. Por exemplo, há um aumento na atividade tanto em ratos

adolescentes como em adultos agudamente tratados com anfetamina, mas em menor extensão em ratos periadolescentes (Bolanos et al., 1998).

Nicotina e psicostimulantes são freqüentemente utilizados em combinação (Volkow, 1997). Além disso, a freqüência de fumar cigarros tem sido associada com a probabilidade e extensão de abuso de psicostimulantes (Schorling et al., 1994). Estudos têm sugerido que essas duas substâncias podem facilitar o uso uma da outra (Horger et al., 1992; Roll et al., 1996), e produzem efeitos fisiológicos e subjetivos semelhantes em humanos (Jones et al., 1999). Algumas evidências também sugerem que efeitos relacionados ao abuso de psicostimulantes e nicotina podem ser mediados por um substrato neural comum, especificamente o sistema dopaminérgico mesolímbico (Pich et al., 1997; Di Chiara, 2000).

Outra evidência relevante é o fato de que o pré-tratamento com uma substância pode aumentar os efeitos sobre a atividade locomotora de outra, evidenciando assim a ocorrência de sensibilização cruzada (Collins & Izenwasser, 2004). Dessa forma, como a sensibilização está associada ao desenvolvimento da dependência, a exposição à determinada substância psicoativa pode aumentar a vulnerabilidade ao desenvolvimento de dependência a outra substância.

A sensibilização cruzada entre nicotina e anfetamina já foi estudada por alguns autores. Por exemplo, Fredriksson et al. (2000) mostraram que a administração de nicotina neonatal pode alterar os efeitos comportamentais induzidos pelo álcool. Além disso, Yang et al. (2003) mostraram que o pré-tratamento com metilfenidato promove sensibilização cruzada com anfetamina.

Esses estudos indicam que a pré-exposição a uma substância provavelmente altera os efeitos comportamentais da outra. Como o uso da

nicotina pode levar ao aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento de dependência a substâncias ilícitas como cocaína e anfetamina (Henningfield et al., 1990; Lindsay & Rainey, 1997), é importante a investigação dos mecanismos relacionados à interação de psicostimulantes e nicotina no sistema nervoso central, especialmente em modelos de adolescência.

2. OBJETIVOS

Nesse estudo investigamos:

a) se o tratamento repetido com anfetamina aumenta a locomoção induzida por nicotina em ratos adolescentes;

b) se o tratamento repetido com nicotina aumenta a locomoção induzida por anfetamina em ratos adolescentes;

c) se o tratamento repetido com anfetamina na adolescência aumenta a locomoção induzida pela nicotina na idade adulta;

d) se o tratamento repetido com nicotina na adolescência aumenta a locomoção induzida pela anfetamina na idade adulta;

Para isso foram avaliados:

a) os efeitos do pré-tratamento com nicotina (0,4 mg/Kg) ou anfetamina (1,0 mg/Kg, 2,5 mg/Kg e 5,0 mg/Kg) do P28-P34 na atividade locomotora induzida pela nicotina ou pela anfetamina três (P37) ou dez (P44) dias após o término do tratamento na adolescência.

b) os efeitos sobre a atividade locomotora da nicotina ou anfetamina 36 dias (P70) após o término do pré-tratamento na adolescência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia do Campus de Araraquara – UNESP no dia pós natal (P) 21 e grupos de 3 a 4 animais foram mantidos em caixas plásticas de 32 x 40 x 16 cm (largura x comprimento x altura) em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07h) com livre acesso a alimento e água.

Os experimentos foram realizados durante a fase de claro. Os animais controles e experimentais foram testados aleatoriamente entre 8h e 17h horas. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (Parecer 18/2004) e os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Os animais receberam o tratamento durante a adolescência, período do P28 ao P42 (Spear, 2000) e os testes foram realizados no P37 e P44 (três e dez dias após o fim do tratamento) ou no P70 (36 dias após o fim do tratamento).

3.2 – Avaliação da atividade locomotora

O registro da atividade locomotora foi realizado em caixa de medida automática da atividade locomotora (Columbus Instruments, CA), medindo 51,1 x 9,5 x 69,2 cm (largura x altura x comprimento) (Figura 1). A caixa de atividade possui 10 emissores



Figura 1 – Caixa de determinação da atividade locomotora

de luz infravermelha, distantes 2,5 cm entre si e a 3 cm do piso da caixa, que são utilizados para a medida da atividade locomotora horizontal. A interrupção de dois feixes de luz consecutivos corresponde a uma unidade de locomoção.

Os animais permaneceram por um período de adaptação de 20 minutos na caixa de atividade antes das injeções. A contagem da locomoção acumulada em intervalos de 15 minutos foi registrada durante uma sessão de teste de 30 ou 45 minutos, após as injeções de nicotina ou anfetamina, respectivamente.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 – Sensibilização comportamental

4.1.1. *Sensibilização comportamental à nicotina em animais adolescentes*

Ratos periadolescentes (P28) foram divididos em dois grupos. Um grupo recebeu injeções subcutâneas (s.c) de nicotina (0,4 mg/Kg) (dose calculada pela concentração da base livre) e o outro grupo recebeu injeções s.c. de salina (1mL/Kg). As injeções foram administradas uma vez ao dia, entre 9h e 17h, durante sete dias (P28-34). Os animais não receberam tratamento no 8º e 9º dias após o pré-tratamento. Três dias após o término do tratamento (dia 10 – P37) o grupo pré-tratado com salina foi subdividido em dois grupos que receberam injeções s.c. de salina ou nicotina (0,4 mg/Kg), enquanto o grupo pré-tratado com nicotina recebeu injeção s.c. de nicotina (0,4 mg/Kg). Dessa forma, tivemos os seguintes grupos: SAL + SAL (n=7), SAL + NIC (n=8) e NIC + NIC (n=8). A atividade locomotora foi registrada como descrito no item 3.2

4.1.2. *Sensibilização comportamental à anfetamina em animais adolescentes*

Ratos periadolescentes (P28) foram divididos em dois grupos. Um grupo recebeu injeção intra-peritoneal (i.p.) de sulfato de anfetamina na dose de 5,0 mg/Kg (dose baseada no peso do sal) e o outro grupo recebeu injeção i.p. de salina (1ml/Kg). As injeções foram administradas uma vez ao dia, entre 9h e 17h, durante sete dias (P28-34). Os animais não receberam tratamento no 8º e 9º dias após o pré-tratamento. Três dias após o término do tratamento (dia 10 – P37) o grupo pré-tratado com salina foi subdividido em dois grupos que receberam injeção i.p. de salina ou anfetamina (1,0 mg/Kg) e o grupo pré-tratado com anfetamina

recebeu injeção i.p. de anfetamina (1,0 mg/Kg). Dessa forma, tivemos os seguintes grupos: SAL + SAL (n=6), SAL + ANF (n=8) e ANF + ANF (n=8). A atividade locomotora foi registrada como descrito no item 3.2

4.2 – Sensibilização cruzada

4.2.1. Pré-tratamentos

Ratos periadolescentes foram divididos em dois grupos. Um grupo recebeu injeção intra-peritoneal (i.p.) de anfetamina (5 mg/Kg) e o outro grupo recebeu injeção sub-cutânea (s.c.) de nicotina (0,4 mg/Kg). Os grupos controles receberam injeção i.p. ou s.c de salina. As injeções foram administradas uma vez ao dia, entre 9h e 17h, durante sete dias (P28-34).

Os animais adolescentes não receberam tratamento entre o 8º e 9º e entre o 11º e 16º dias após o pré-tratamento. O registro da atividade locomotora, para avaliar a sensibilização cruzada, foi realizado no P37 e P44 (três e sete dias após a suspensão dos pré-tratamentos).

Um grupo distinto de animais adolescentes recebeu o mesmo pré-tratamento descrito acima e permaneceu na gaiola-viveiro sem nenhum tratamento até a idade adulta (P70). No P70 (36 dias após a suspensão dos pré-tratamentos) registrou-se a atividade locomotora após a injeção de nicotina ou anfetamina para se avaliar a sensibilização cruzada.

4.2.2. Locomoção induzida pela nicotina em animais adolescentes pré-tratados com anfetamina

No 10º (P37) e 17º (P44) dias (testes) os grupos pré-tratados com salina (SAL) ou anfetamina (ANF) receberam injeção subcutânea de nicotina (NIC) (0.4

mg/Kg; s.c.) ou salina (SAL). Dessa forma, no dia do teste tivemos os seguintes grupos: SAL + SAL (n=7), ANF + SAL (n=7), SAL + NIC (n=5) e ANF + NIC (n=7). Imediatamente após as injeções a atividade locomotora foi registrada como descrito no item 3.2.

4.2.3. Locomoção induzida pela anfetamina em animais adolescentes pré-tratados com nicotina

No 10º (P37) e 17º dias (P44) (testes) os grupos pré-tratados com salina (SAL) ou nicotina (NIC) receberam injeções intraperitoneais de anfetamina (ANF) (1,0 mg/Kg; 2,5 mg/Kg ou 5,0 mg/Kg; i.p.) ou salina (SAL). Dessa forma, no dia do teste tivemos os seguintes grupos: SAL + SAL (n=13), NIC + SAL (n=13), SAL + ANF 1,0 (n=9), SAL + ANF 2,5 (n=8), SAL + ANF 5,0 (n=7), NIC + ANF 1,0 (n=9), NIC + ANF 2,5 (n=8) e NIC + ANF 5,0 (n=8). Imediatamente após as injeções a atividade locomotora foi registrada como descrito no item 3.2.

4.2.4. Locomoção induzida pela nicotina em animais adultos tratados com anfetamina na adolescência

Na idade adulta (P70) os animais pré-tratados com salina (SAL) ou anfetamina (ANF) (5.0 mg/Kg; i.p.) na adolescência receberam injeção subcutânea de nicotina (NIC) (0,4 mg/Kg, s.c.) ou salina. Dessa forma, no dia do teste tivemos os seguintes grupos: SAL + SAL (n=8), ANF + SAL (n=8), SAL + NIC (n=6) e ANF + NIC (n=8). Imediatamente após as injeções a atividade locomotora foi registrada como descrito no item 3.2.

4.2.5. Locomoção induzida pela anfetamina em animais adultos tratados com nicotina na adolescência

Na idade adulta (P70) os animais pré-tratados com nicotina na adolescência receberam injeções intraperitoneais de anfetamina (ANF) (1,0 mg/Kg; 2,5 mg/Kg ou 5,0 mg/Kg; i.p.) ou salina (SAL). Dessa forma, no dia do teste tivemos os seguintes grupos: SAL + SAL (n=15), NIC + SAL (n=13), SAL + ANF 1,0 (n=10), SAL + ANF 2,5 (n=10), SAL + ANF 5,0 (n=8), NIC + ANF 1,0 (n=10), NIC + ANF 2,5 (n=9) e NIC + ANF 5,0 (n=8). Imediatamente após as injeções a atividade locomotora foi registrada como descrito no item 3.2.

4.3 – Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm EPM. A atividade locomotora foi analisada utilizando-se ANOVA multifatorial.

Nos experimentos de sensibilização à nicotina ou anfetamina na adolescência (item 4.1) foram considerados os fatores intervalo após a injeção e tratamento.

Nos experimentos de sensibilização cruzada (item 4.2), foram considerados os seguintes fatores:

- Na adolescência: tratamento, intervalo após injeção e dia.
- Na idade adulta: tratamento e intervalo após injeção.

Quando ANOVA revelou significância estatística, análises adicionais foram realizadas utilizando-se o teste F para contraste entre os pares de médias. Foram considerados significativos os resultados com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Descrevemos apenas os resultados para os quais ANOVA e teste F mostraram diferenças significativas. A descrição completa da análise estatística pode ser encontrada no Anexo 1.

5.1 – Sensibilização comportamental

5.1.1. *Sensibilização comportamental à nicotina em animais adolescentes*

A figura 2 mostra os resultados da avaliação da sensibilização comportamental à nicotina em ratos adolescentes. ANOVA revelou diferenças significativas na locomoção induzida pela nicotina considerando-se os fatores tratamento [$F(2,20) = 11,36$; $p < 0,05$] e intervalo após injeção [$F(1,20) = 124,58$; $p < 0,05$]. Além disso, houve interação entre os dois fatores [$F(2,20) = 11,05$; $p < 0,05$].

Comparações entre os pares de média revelaram que a nicotina aumentou a atividade locomotora nos animais pré-tratados com salina ou nicotina quando comparados ao grupo SAL + SAL nos dois intervalos de tempo analisados.

SAL + NIC vs SAL + SAL: 0-15 min: [$F(1,20) = 16,49$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,20) = 6,90$; $p < 0,05$];

NIC + NIC vs SAL + SAL: 0-15 min: [$F(1,20) = 27,11$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,20) = 5,17$; $p < 0,05$].

Porém, o pré-tratamento com nicotina não alterou a locomoção induzida pela injeção dessa substância 3 dias após a suspensão do tratamento.

SAL + NIC vs NIC + NIC: 0-15 min: [$F(1,20) = 1,41$; $p = 0,25$]; 15-30 min: [$F(1,20) = 0,13$; $p = 0,72$].

Os resultados demonstram que não ocorre a sensibilização comportamental à nicotina em animais adolescentes.

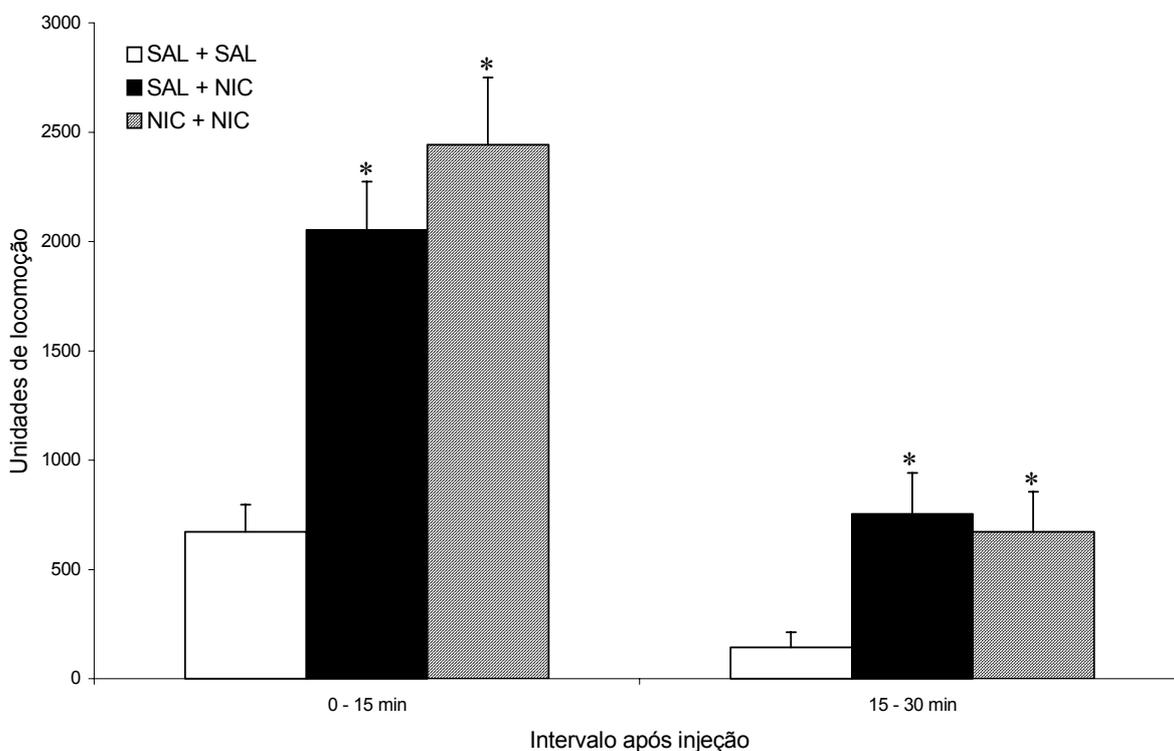


Figura 2 – Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou nicotina 0,4 mg/Kg em ratos adolescentes 3 dias após a interrupção do tratamento com nicotina (0,4 mg/Kg, s.c.) ou salina durante 7 dias consecutivos. Os dados representam a média dos valores \pm EPM ($n = 7-8$ animais por grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + SAL.

5.1.2. Sensibilização comportamental à anfetamina em animais adolescentes

A figura 3 mostra os resultados da avaliação da sensibilização comportamental à anfetamina em ratos adolescentes

ANOVA revelou diferenças significativas considerando-se os fatores tratamento [$F(2,19) = 9,05$; $p < 0,05$] e intervalo após injeção [$F(2,38) = 3,77$;

$p < 0,05$], e ainda mostrou interação significativa entre eles [$F(4,38) = 7,36$; $p < 0,05$].

Comparações dos pares de média pelo teste F demonstrou que, nos intervalos de 15-30 e 30-45 minutos, a injeção de anfetamina aumentou significativamente a locomoção nos grupos pré-tratados com salina (SAL + ANF) e anfetamina (ANF + ANF) comparando-se com o grupo SAL + SAL.

SAL + SAL vs SAL + ANF: 15-30 min: [$F(1,19) = 8,57$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,19) = 7,237$; $p < 0,05$];

SAL + SAL vs ANF + ANF: 15-30 min: [$F(1,19) = 23,14$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,19) = 17,684$; $p < 0,05$].

Além disso, no intervalo de 15-30 minutos, os animais pré-tratados com anfetamina apresentaram maior atividade locomotora após a injeção de anfetamina quando comparados aos animais pré-tratados com salina.

SAL + ANF vs ANF + ANF: [$F(1,19) = 5,082$; $p < 0,05$].

Esses resultados indicam a presença de sensibilização comportamental à anfetamina em ratos adolescentes.

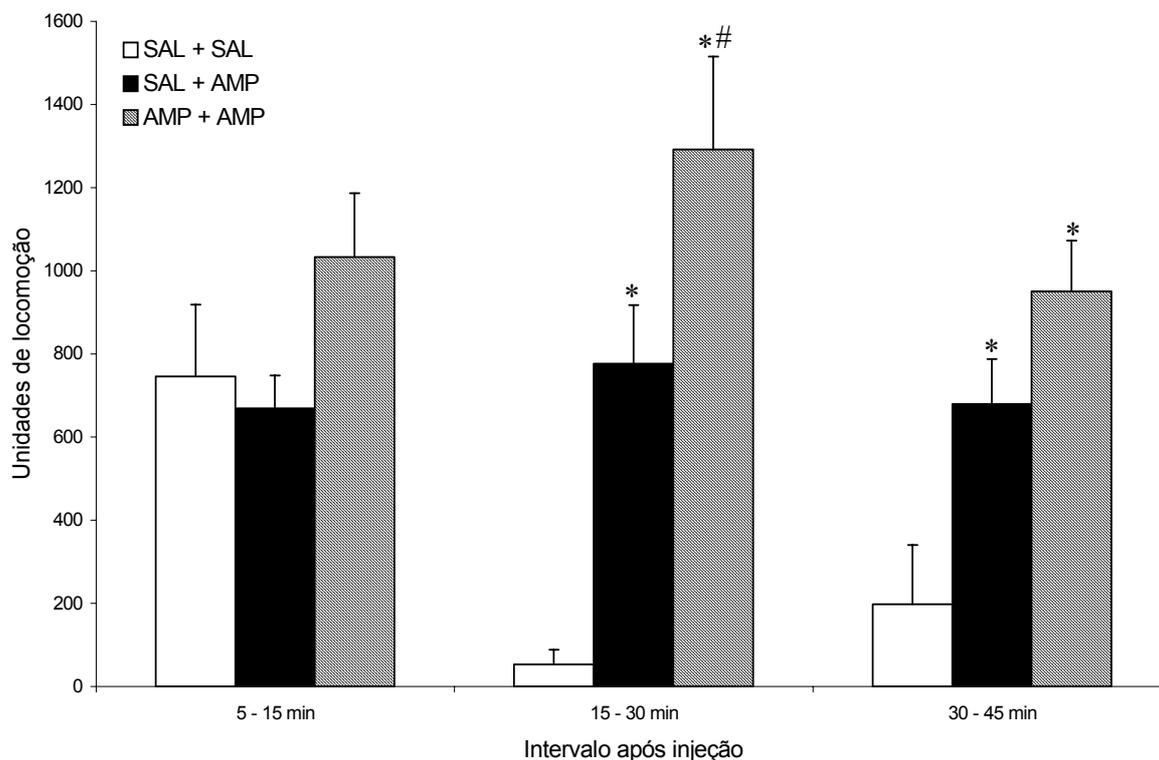


Figura 3 - Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou anfetamina 1,0 mg/Kg em ratos adolescentes 3 dias após a interrupção do tratamento com anfetamina (5,0 mg/Kg, i.p.) ou salina durante 7 dias consecutivos. Os dados representam a média dos valores \pm EPM ($n = 6-8$ animais por grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + SAL. # $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + ANF.

5.2 – Sensibilização cruzada

5.2.1. Locomoção induzida pela nicotina em animais adolescentes pré-tratados com anfetamina

A figura 4 mostra os resultados da sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina em ratos adolescentes. Em animais adolescentes, houve diferenças significativas na locomoção induzida pela nicotina considerando-se os

fatores tratamento [$F(3,22) = 24,42$; $p < 0,05$] e intervalo após injeção [$F(1,22) = 113,88$; $p < 0,05$], mas não o fator dia [$F(1,22) = 2,25$; $p = 0,15$]. Além disso, houve interação entre os fatores tratamento e dia [$F(3,22) = 3,44$; $p < 0,05$] e tratamento e intervalo após injeção [$F(3,22) = 18,61$; $p < 0,05$], mas não entre os fatores dia e intervalo após injeção [$F(1,22) = 0,28$; $p = 0,60$] e os fatores tratamento, dia e intervalo após injeção [$F(3,22) = 0,57$; $p = 0,64$].

Comparações entre os pares de média revelaram que no dia 10 no intervalo de 0-15 minutos, a nicotina aumentou a locomoção tanto em grupos pré-tratados com salina (SAL + NIC) como em pré-tratados com anfetamina (ANF + NIC) comparando-se com a locomoção induzida por salina:

SAL + SAL vs SAL + NIC: [$F(1,22) = 10,75$; $p < 0,05$];

ANF + SAL vs SAL + NIC: [$F(1,22) = 15,45$; $p < 0,05$];

SAL + SAL vs ANF + NIC: [$F(1,22) = 42,82$; $p < 0,05$];

ANF + SAL vs ANF + NIC: [$F(1,22) = 52,67$; $p < 0,05$].

No intervalo de 15-30 minutos a diferença foi observada somente comparando-se os grupos ANF + SAL e ANF + NIC [$F(1,22) = 11,35$; $p < 0,05$].

No dia 17, nos intervalos de 0-15 e 15-30 minutos, fazendo-se essa mesma comparação, também se observa o aumento da atividade locomotora induzida pela nicotina:

SAL + SAL vs SAL + NIC: 0-15 min: [$F(1,22) = 18,10$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,22) = 12,85$; $p < 0,05$];

ANF + SAL vs SAL + NIC: 0-15 min: [$F(1,22) = 18,69$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,22) = 17,89$; $p < 0,05$];

SAL + SAL vs ANF + NIC: 0-15 min: [$F(1,22) = 14,21$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,22) = 4,99$; $p < 0,05$];

ANF + SAL vs ANF + NIC: 0-15 min: $[F(1,22) = 14,78; p < 0,05]$; 15-30 min: $[F(1,22) = 8,65; p < 0,05]$.

E ainda, o pré-tratamento com anfetamina aumentou a locomoção induzida pela nicotina comparando-se com o grupo pré-tratado com salina no dia 10:

SAL + NIC vs ANF + NIC: 0-15 minutos $[F(1,22) = 7,26; p < 0,05]$.

Os resultados demonstram a presença de sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina em ratos adolescentes.

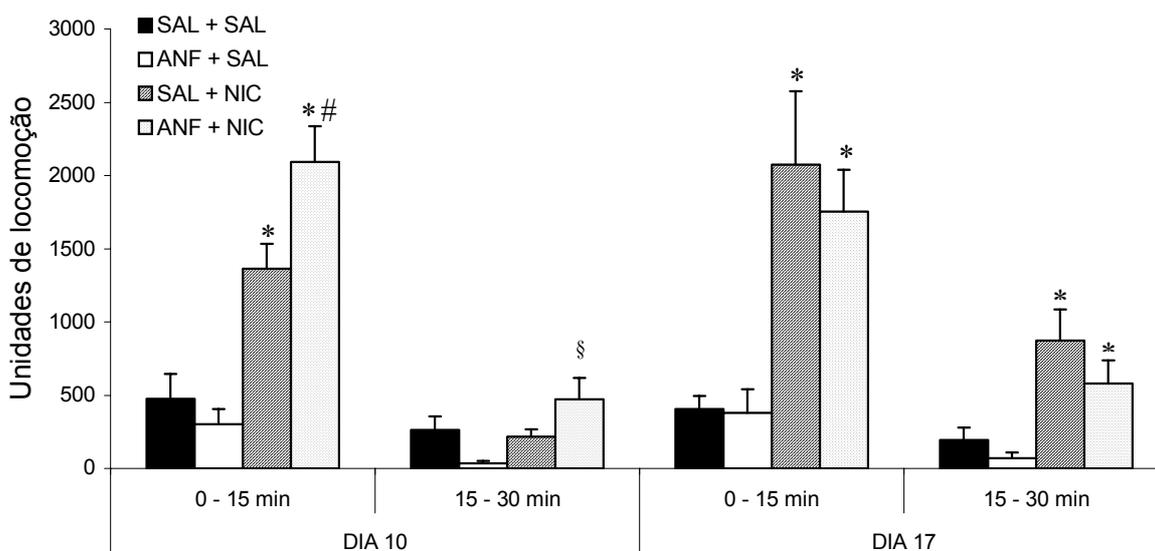


Figura 4 – Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou nicotina 0,4 mg/Kg em ratos adolescentes 3 e 10 dias após a interrupção do tratamento com anfetamina (5,0 mg/Kg, i.p.) ou salina durante 7 dias consecutivos. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 5-7$ animais por grupo) * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL + SAL e ANF + SAL. # $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + NIC. § $p < 0,05$ comparado ao grupo ANF + SAL.

5.2.2. Locomoção induzida pela anfetamina em animais adolescentes pré-tratados com nicotina

Em animais adolescentes pré-tratados com nicotina, a locomoção induzida pela anfetamina apresentou diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(7,67) = 20,29$; $p < 0,05$] e intervalo após injeção [$F(2,134) = 10,07$; $p < 0,05$], mas não em relação ao fator dia [$F(1,67) = 1,71$; $p = 0,19$] (Fig. 5 A e B). Além disso, houve interações significativas entre os fatores tratamento e intervalo após injeção [$F(14,134) = 4,77$; $p < 0,05$], dia e intervalo após injeção [$F(2,134) = 10,41$; $p < 0,05$] e tratamento, dia e intervalo após injeção [$F(14,134) = 3,64$; $p < 0,05$], mas não entre os fatores tratamento e dia [$F(7,67) = 1,14$; $p = 0,35$].

Análises entre os pares de médias pelo teste F revelaram que nas doses de 2,5 e 5,0 mg/Kg, a anfetamina aumentou a locomoção nos animais pré-tratados com salina (SAL + ANF) comparando-se com o grupo SAL + SAL:

SAL + ANF 2,5 vs SAL + SAL:

Dia 10 - 0-15 min: [$F(1,67) = 4,63$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,67) = 22,38$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,67) = 21,65$; $p < 0,05$];

Dia 17 - 0-15 min: [$F(1,67) = 13,76$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,67) = 8,36$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,67) = 11,40$; $p < 0,05$];

SAL + ANF 5,0 vs SAL + SAL:

Dia 10 - 0-15 min: [$F(1,67) = 7,71$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,67) = 41,19$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,67) = 40,69$; $p < 0,05$];

Dia 17 - 0-15 min: [$F(1,67) = 51,06$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,67) = 13,60$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,67) = 10,25$; $p < 0,05$].

E também nos animais pré-tratados com nicotina (NIC + ANF):

NIC + ANF 2,5 vs SAL + SAL:

Dia 10 - 0-15 min: [F(1,67) = 9,31; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,67) = 21,99; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 19,48; p<0,05];

Dia 17 - 0-15 min: [F(1,67) = 4,21; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,67) = 6,37; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 9,16; p<0,05];

NIC + ANF 5,0 vs SAL + SAL:

Dia 10 - 0-15 min: [F(1,67) = 26,63; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,67) = 68,18; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 54,56; p<0,05];

Dia 17 - 0-15 min: [F(1,67) = 108,01; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,67) = 47,07; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 34,68; p<0,05].

Em comparações entre NIC + SAL e ANF 2,5 e 5,0 mg/Kg nos animais pré-tratados com salina (SAL + ANF) e nicotina (NIC + ANF), as diferenças também foram significativas nos seguintes intervalos:

NIC + SAL vs SAL + ANF 2,5:

Dia 10 - 15-30 min: [F(1,67) = 21,23; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 20,93; p<0,05];

Dia 17 - 0-15 min: [F(1,67) = 9,92; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,67) = 7,35; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 11,34; p<0,05];

NIC + SAL vs NIC + ANF 2,5:

Dia 10 - 0-15 min: [F(1,67) = 5,61; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,67) = 20,86; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 18,81; p<0,05];

Dia 17 - 15-30 min: [F(1,67) = 5,50; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 9,11; p<0,05];

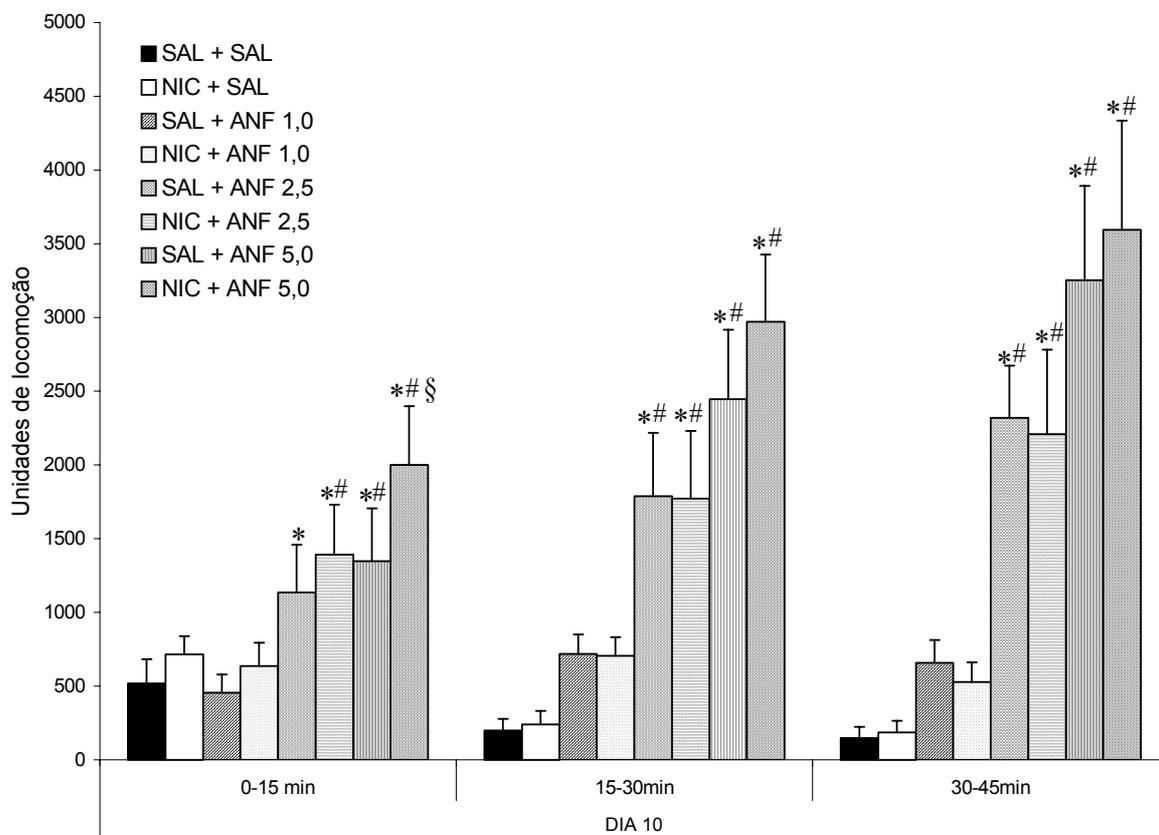


Figura 5 A - Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou anfetamina nas doses de 5,0; 2,5 e 1,0 mg/Kg em ratos adolescentes 3 dias após a interrupção do tratamento com nicotina (0,4 mg/Kg, s.c.) ou salina durante 7 dias consecutivos. Os dados representam a média \pm EPM (n = 7-13 animais por grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + SAL. # $p < 0,05$ comparado ao grupo NIC + SAL. § $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + ANF 5,0.

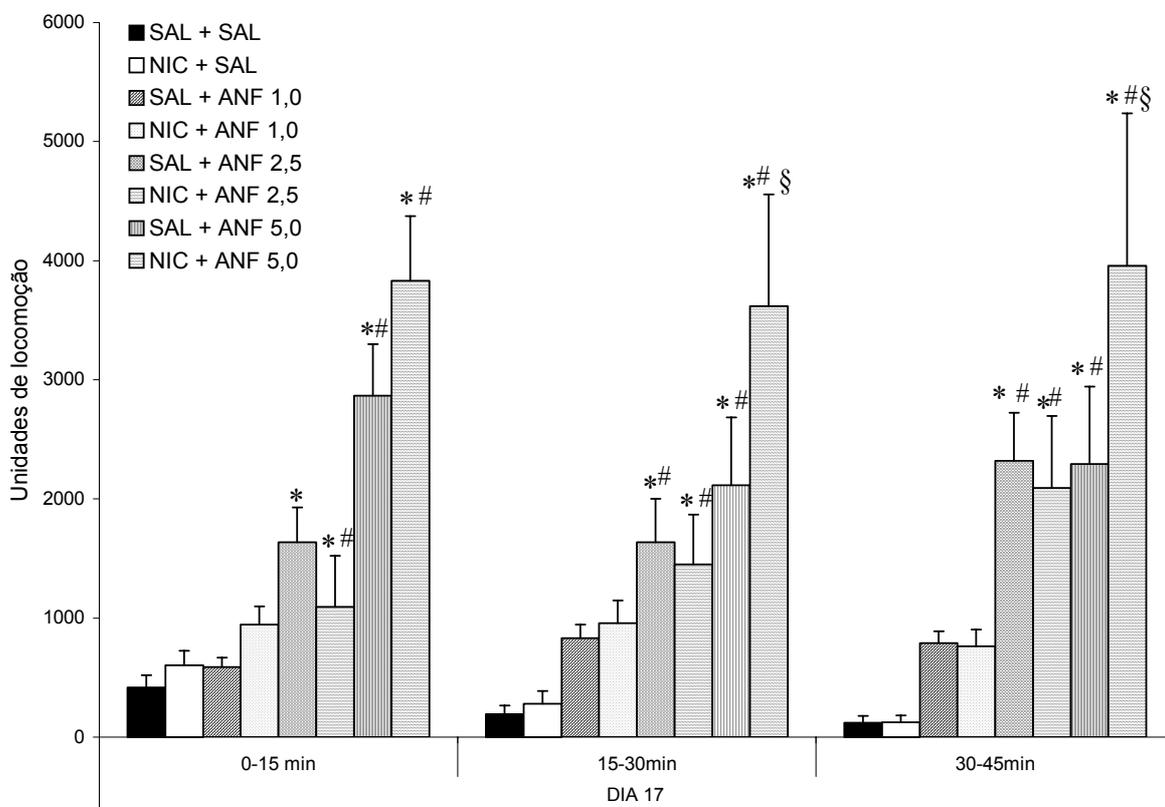


Figura 5 B – Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou anfetamina nas doses de 5,0; 2,5 e 1,0 mg/Kg em ratos adolescentes 10 dias após a interrupção do tratamento com nicotina (0,4 mg/Kg, s.c.) ou salina durante 7 dias consecutivos. Os dados representam a média \pm EPM (n = 7-13 animais por grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + SAL. # $p < 0,05$ comparado ao grupo NIC + SAL. § $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + ANF 5,0.

NIC + SAL vs SAL + ANF 5,0:

Dia 10 - 0-15 min: [F(1,67) = 4,50; $p < 0,05$]; 15-30 min: [F(1,67) = 39,69; $p < 0,05$]; 30-45 min: [F(1,67) = 39,75; $p < 0,05$];

Dia 17 - 0-15 min: [F(1,67) = 43,70; $p < 0,05$]; 15-30 min: [F(1,67) = 12,37; $p < 0,05$]; 30-45 min: [F(1,67) = 10,19; $p < 0,05$];

NIC + SAL vs NIC + ANF 5,0:

Dia 10 - 0-15 min: [F(1,67) = 20,04; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,67) = 66,17; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 53,42; p<0,05];

Dia 17 - 0-15 min: [F(1,67) = 96,70; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,67) = 44,64; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 34,58; p<0,05].

Além disso, o pré-tratamento com nicotina modificou a locomoção induzida pela anfetamina na dose de 5,0 mg/Kg (NIC + ANF 5,0), comparando-se com o grupo pré-tratado com salina (SAL + ANF 5,0):

SAL + ANF 5,0 vs NIC + ANF 5,0:

Dia 10 - 0-15 min: [F(1,67) = 3,86; p<0,05];

Dia 17 - 0-15 min: [F(1,67) = 6,50; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,67) = 6,84; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,67) = 4,90; p<0,05].

Esses resultados mostram a sensibilização cruzada entre nicotina e anfetamina na dose de 5,0 mg/Kg em ratos adolescentes.

5.2.3. Locomoção induzida pela nicotina em animais adultos pré-tratados com anfetamina na adolescência

Os resultados desses experimentos estão representados na figura 6.

ANOVA revelou diferenças significativas na locomoção induzida pela nicotina considerando os fatores tratamento [F(3,26)= 6,29, p<0,05] e intervalo após injeção [F(1,26)= 18,57, p<0,05]. Não foi detectada interação entre os fatores [F(3,26)=0,39, p=0,76].

O teste F para contrastes revelou que a locomoção após a injeção de nicotina foi significativamente maior no grupo pré-tratado com anfetamina (ANF + NIC) comparando-se com a locomoção induzida pela salina:

ANF + NIC vs SAL + SAL: 0-15 min: $[F(1,26) = 7,43, p < 0,05]$; **15-30 min:** $[F(1,26) = 12,53, p < 0,05]$;

ANF + NIC vs ANF + SAL: 0-15 min: $[F(1,26) = 8,84, p < 0,05]$; **15-30 min:** $[F(1,26) = 12,25, p < 0,05]$.

A nicotina não aumentou a locomoção em animais adultos pré-tratados com salina na adolescência, comparando-se com o grupo SAL + SAL. Nos animais pré-tratados com anfetamina, ocorre aumento significativo da atividade locomotora comparando-se com o mesmo grupo, mostrando a sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina em ratos adultos.

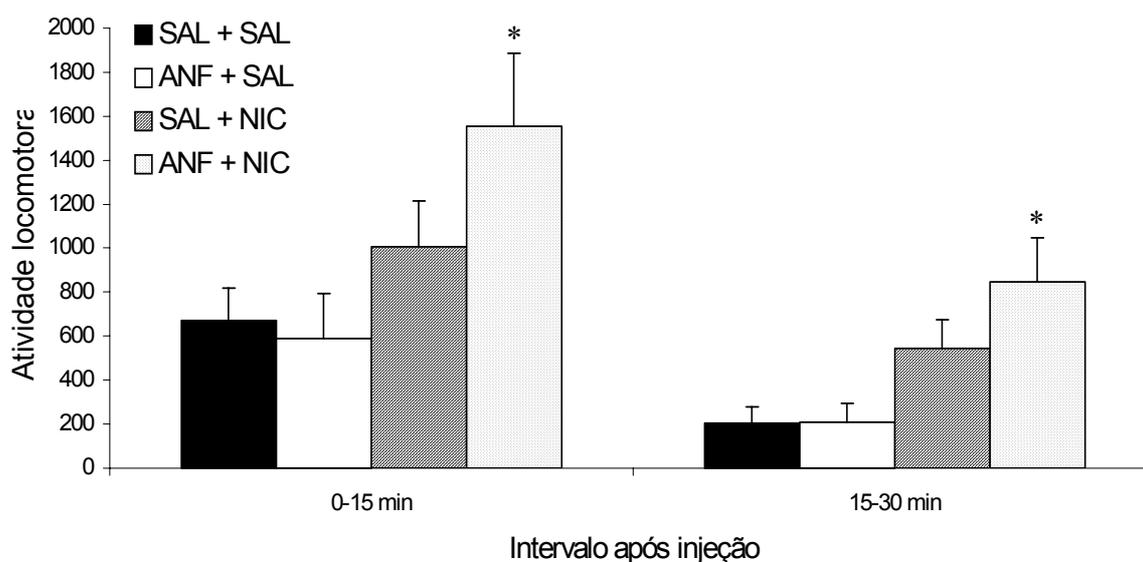


Figura 6 - Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou nicotina (0,4 mg/Kg, s.c.) em ratos adultos 36 dias após a interrupção do tratamento com anfetamina (5,0 mg/Kg, i.p.) ou salina durante 7 dias consecutivos na adolescência. Os dados representam a média \pm EPM (n = 6-8 animais por grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + SAL.

5.2.4. Locomoção induzida pela anfetamina em animais adultos pré-tratados com nicotina na adolescência

A figura 7 mostra os resultados desse experimento.

Para os animais adultos pré-tratados com nicotina na adolescência, ANOVA revelou diferenças significativas para os fatores tratamento [$F(7,75) = 15,92$; $p < 0,05$] e intervalo após injeção [$F(2,150) = 294,02$; $p < 0,05$] e ainda interação entre esses fatores [$F(14,150) = 13,84$; $p < 0,05$].

Na comparação entre os pares de média, foi verificado que a anfetamina aumentou significativamente a locomoção em animais pré-tratados com salina (SAL + ANF) e nicotina (NIC + ANF) nas doses de 2,5 e 5,0 mg/Kg comparando-se com a locomoção induzida pela salina em animais pré-tratados com salina (SAL + SAL):

SAL + SAL vs SAL + ANF 2,5: 0-15 min: [$F(1,75) = 47,98$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,75) = 53,47$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,75) = 47,11$; $p < 0,05$];

SAL + SAL vs NIC + ANF 2,5: 0-15 min: [$F(1,75) = 38,38$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,75) = 35,57$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,75) = 29,31$; $p < 0,05$];

SAL + SAL vs SAL + ANF 5,0: 0-15 min: [$F(1,75) = 20,86$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,75) = 17,56$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,75) = 17,12$; $p < 0,05$];

SAL + SAL vs NIC + ANF 5,0: 0-15 min: [$F(1,75) = 35,92$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,75) = 30,06$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,75) = 21,69$; $p < 0,05$].

E também nos animais pré-tratados com nicotina (NIC + SAL):

NIC + SAL vs SAL + ANF 2,5: 0-15 min: [$F(1,75) = 44,55$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,75) = 49,99$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,75) = 43,86$; $p < 0,05$];

NIC + SAL vs NIC + ANF 2,5: 0-15 min: [$F(1,75) = 35,72$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,75) = 33,33$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,75) = 27,31$; $p < 0,05$];

NIC + SAL vs SAL + ANF 5,0: 0-15 min: [$F(1,75) = 19,39$; $p < 0,05$]; 15-30 min: [$F(1,75) = 16,47$; $p < 0,05$]; 30-45 min: [$F(1,75) = 15,95$; $p < 0,05$];

NIC + SAL vs NIC + ANF 5,0: 0-15 min: [F(1,75) = 33,57; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,75) = 28,27; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,75) = 20,25; p<0,05].

Na dose de 1,0 mg/Kg, a anfetamina aumentou significativamente a locomoção nos animais pré-tratados com nicotina (NIC + ANF 1,0) comparando-se com a injeção de salina nos animais pré-tratados com salina (SAL + SAL):

SAL + SAL vs NIC + ANF 1,0: 0-15 min: [F(1,75) = 21,65; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,75) = 23,10; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,75) = 9,70; p<0,05].

E também nos animais pré-tratados com nicotina (NIC + SAL):

NIC + SAL vs NIC + ANF 1,0: 0-15 min: [F(1,75) = 19,95; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,75) = 21,50; p<0,05]; 30-45 min: [F(1,75) = 8,90; p<0,05].

Além disso, na dose de 1,0 mg/Kg os animais pré-tratados com nicotina apresentaram uma locomoção significativamente maior em resposta à anfetamina que os animais pré-tratados com salina:

SAL + ANF 1,0 vs NIC + ANF 1,0: 0-15 min: [F(1,75) = 10,12; p<0,05]; 15-30 min: [F(1,75) = 8,70; p<0,05].

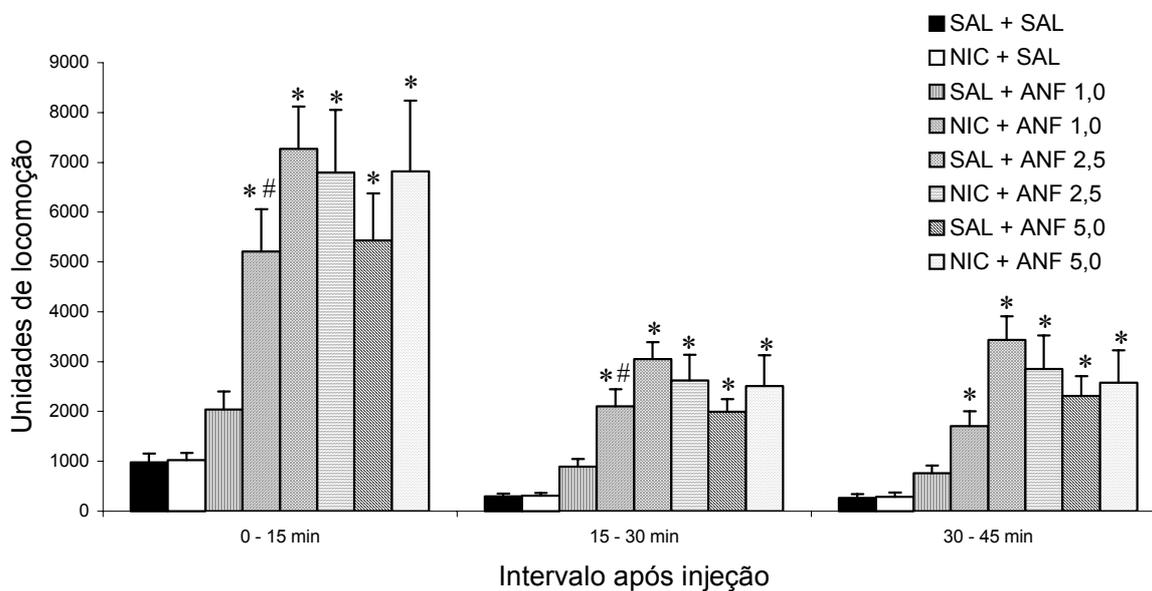


Figura 7 - Os histogramas representam a atividade locomotora após injeções de salina ou anfetamina nas doses de 5,0; 2,5 e 1,0 mg/Kg em ratos adultos 36 dias após a interrupção do tratamento com nicotina (0,4 mg/Kg, s.c.) ou salina durante 7 dias consecutivos na adolescência. Os dados representam a média \pm EPM (n = 8-15 animais por grupo). * $p < 0,05$ comparado aos grupos SAL + SAL e NIC + SAL. # $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL + ANF 1,0.

6. DISCUSSÃO

A sensibilização comportamental reflete neuroadaptações no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que estão envolvidas no desenvolvimento da dependência às substâncias psicoativas. A nicotina e a anfetamina promovem sensibilização comportamental em animais adultos, mas em adolescentes existem poucos estudos. Além disso, o pré-tratamento com uma determinada substância pode modificar a resposta comportamental a outra substância, promovendo então a sensibilização cruzada. A sensibilização cruzada indica que a exposição a uma substância psicoativa pode aumentar a vulnerabilidade ao abuso de outra substância.

Como o cigarro e substâncias anfetamínicas são amplamente utilizados por adolescentes, é importante o conhecimento de como essas substâncias interagem nos efeitos comportamentais e se esses efeitos são duradouros. Nesse estudo, avaliamos a sensibilização comportamental à nicotina e à anfetamina em animais adolescentes e também a sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina e vice-versa. Além disso, investigamos se o tratamento repetido com essas substâncias psicoativas na adolescência modifica o desenvolvimento da sensibilização comportamental na idade adulta.

Avaliamos inicialmente a sensibilização à nicotina e anfetamina na adolescência. Nossos resultados demonstram que o tratamento repetido com nicotina não induz sensibilização comportamental em ratos adolescentes, enquanto a anfetamina promove sensibilização comportamental nesses animais, corroborando relatos anteriores da literatura biomédica (Vanderschuren et al. 1999; Faraday et al. 2003; Collins & Izenwasser, 2004; Cruz et al, 2005).

O fenômeno da sensibilização comportamental é uma característica comum para todas as substâncias de abuso, e está relacionado ao desenvolvimento de dependência, principalmente de psicostimulantes. Apesar da relação entre a sensibilização comportamental e dependência à nicotina não estar bem estabelecida, foi relatado que as alterações induzidas pela nicotina no sistema dopaminérgico mesolímbico podem ser similares às aquelas produzidas pelos psicostimulantes. Por exemplo, foi mostrado que a administração repetida de nicotina aumenta a aferência dopaminérgica acumbal (Benwell e Balfour, 1992; Shim et al., 2001). Além disso, a administração crônica de nicotina aumenta a resposta locomotora ao agonista de receptor dopaminérgico D1/D2 apomorfina (Suemaru et al., 1993).

Já que a exposição a uma substância pode predispor ao uso da outra (Collins & Izenwasser, 2004), nesse estudo avaliamos a sensibilização cruzada entre nicotina e anfetamina e vice-versa. Na adolescência, a locomoção induzida pela injeção de nicotina em animais adolescentes pré-tratados com anfetamina (ANF + NIC) foi maior do que a observada após a injeção daquela substância em animais pré-tratados com salina (SAL + NIC) e esse efeito ocorreu no intervalo de 0-15 minutos, três dias após a suspensão do tratamento com anfetamina (dia 10). Além do pré-tratamento com anfetamina ter aumentado significativamente a locomoção induzida pela nicotina, também prolongou esse efeito, observando-se que a locomoção foi significativamente maior no grupo ANF + NIC comparando-se com a locomoção induzida pela salina em animais pré-tratados com anfetamina (ANF + SAL) no intervalo de 15-30 minutos do dia 10. Esses resultados indicam a sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina em

animais adolescentes. Do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo descrevendo a sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina.

No segundo dia de teste (dez dias após a suspensão do tratamento com anfetamina - dia 17), a sensibilização cruzada não foi verificada. Considerando-se que essa injeção foi no P44, esse resultado pode ser devido à maior locomoção induzida pela segunda injeção de nicotina. De fato, em adultos uma única injeção de nicotina é capaz de promover aumento de seus efeitos reforçadores, bem como tolerância ou sensibilização na segunda exposição a essa substância (Beluzzi et al., 2004).

Considerando a hipótese de que a sensibilização está relacionada à dependência, podemos sugerir que a exposição a psicostimulantes aumenta a vulnerabilidade à nicotina. Este fato é particularmente relevante no Brasil devido ao fato de que muitos adolescentes, especialmente do sexo feminino, utilizam anorexígenos anfetamínicos. Neste sentido, resultados preliminares do nosso laboratório demonstraram que o pré-tratamento com femproporex produz resultados semelhantes à anfetamina (Santos et al., 2005). Os animais pré-tratados com 5,0 mg/Kg de femproporex apresentam locomoção significativamente maior à injeção de nicotina comparando-se com os animais pré-tratados com salina no intervalo de 15-30 minutos do dia 10. Esses resultados indicam que o pré-tratamento com femproporex modifica a resposta comportamental à nicotina, prolongando seu efeito.

Investigamos também se o pré-tratamento com nicotina modificaria os efeitos da anfetamina em ratos adolescentes. Nossos resultados em animais pré-tratados com salina mostraram que a injeção de 2,5 e 5,0 mg/Kg de anfetamina aumentou significativamente a locomoção na adolescência. Nos animais pré-

tratados com nicotina a locomoção induzida por anfetamina na dose de 5,0 mg/Kg (NIC + ANF 5,0) foi significativamente maior do que nos pré-tratados com salina (SAL + ANF 5,0), mostrando a sensibilização cruzada. Nas doses de 1,0 e 2,5 mg/Kg, a sensibilização cruzada não foi observada.

A sensibilização cruzada entre nicotina e psicostimulantes em ratos expostos à nicotina durante a adolescência também foi relatada em outros estudos (Collins & Izenwasser, 2004; Collins et al, 2004b). Esses autores mostram que o pré-tratamento com nicotina (0,4 mg/Kg) durante a adolescência aumenta a locomoção induzida por cocaína e anfetamina (Collins & Izenwasser, 2004; Collins et al, 2004b). No trabalho com anfetamina (Collins et al, 2004b) os animais foram submetidos a dois tipos de pré-tratamentos. Eles receberam injeções diárias de 0,4 mg/Kg de nicotina por sete dias, mas um grupo uma vez ao dia e outro grupo duas vezes ao dia. Um dia após o término do tratamento, os animais receberam injeção de anfetamina na dose de 1,0 mg/Kg e a sensibilização cruzada foi verificada com os dois tipos de pré-tratamento. Esses autores administraram anfetamina 1,0 mg/Kg, sugerindo que a sensibilização pode ocorrer em doses menores, mas devemos considerar a diferença na forma de administração. A administração foi feita no regime de doses baixas cumulativas, diferente do nosso trabalho em que foram aplicadas injeções únicas para cada dose. A administração em doses cumulativas pode ter aumentado o tempo médio para se observar queda na concentração de anfetamina, formando um platô e com a injeção única, a queda na concentração ocorre mais rapidamente, o que pode explicar a sensibilização somente em doses maiores, verificada no nosso estudo.

O fato de ocorrer sensibilização cruzada entre essas duas substâncias psicoativas sugere que mecanismos comuns poderiam mediar a sensibilização comportamental induzida por anfetamina e nicotina. Por exemplo, estudos indicam que a sensibilização comportamental induzida pela anfetamina pode estar relacionada a alterações dos receptores colinérgicos nicotínicos. De Rover et al. (2004) mostraram, através de ensaios comportamentais e eletrofisiológicos, que a sensibilização comportamental à anfetamina está associada com a supersensibilidade da ativação endógena de receptores colinérgicos nicotínicos.

Outro aspecto importante da sensibilização é o fato de que ela é duradoura. Assim, Vanderschuren et al. (1999) mostraram que uma única injeção de anfetamina produz sensibilização dos efeitos sobre a atividade locomotora, que se intensifica com o tempo. A sensibilização à anfetamina é marginal em três dias após o tratamento e mais evidente após uma semana, enquanto três semanas após o tratamento foi observada a sensibilização cruzada a uma injeção de cocaína.

Recentemente, Ciccocioppo et al. (2004) relataram que o estímulo ambiental associado a uma auto-administração de cocaína promoveu uma forte busca por cocaína que persistiu por até um ano. Essas evidências sugerem que alterações moleculares e neuroquímicas induzidas por psicostimulantes são duradouras e podem alterar respostas comportamentais à droga até mesmo quando os animais são expostos após longos períodos de abstinência. As alterações duradouras induzidas por psicostimulantes podem estar relacionadas com recaída à utilização dessas substâncias.

Porém, o efeito duradouro de psicostimulantes na atividade locomotora tem sido estudado principalmente em animais adultos. Poucos estudos têm

examinado os efeitos do pré-tratamento com psicostimulantes durante a adolescência na atividade locomotora induzida pela nicotina em ratos adultos. Então, em nosso estudo investigamos a resposta locomotora à nicotina em ratos adultos pré-tratados com anfetamina na adolescência para verificar se a sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina observada durante a adolescência persistiria até a idade adulta.

Nesse estudo, 0,4 mg/Kg de nicotina não induziu aumento significativo na locomoção em animais adultos pré-tratados com salina na adolescência, resultado que contrasta com o fato de que a mesma dose de nicotina aumentou significativamente a locomoção em ratos periadolescentes. Esses resultados estão de acordo com trabalhos prévios do nosso laboratório (Cruz et al., 2005) e com observações de outros autores (Faraday et al., 2003, Schochet et al., 2004, Collins & Izenwasser, 2004). Esses resultados mostram que ratos adolescentes apresentam maior sensibilidade à injeção aguda de nicotina.

Os resultados do presente estudo também mostraram que, embora não tenha sido detectada diferença significativa comparando-se os grupos SAL + NIC e ANF + NIC, o tratamento repetido com anfetamina na adolescência aumentou significativamente a atividade locomotora induzida pela nicotina em ratos adultos (ANF + NIC) comparando-se com a locomoção induzida pela salina (SAL + SAL ou ANF + SAL). Como a injeção de nicotina em animais pré-tratados com salina não aumenta a locomoção em ratos adultos, o pré-tratamento com anfetamina modifica a resposta comportamental à nicotina, mostrando a sensibilização cruzada também na idade adulta. Essas observações sugerem que as neuroadaptações induzidas pela anfetamina na adolescência persistem até a

idade adulta e a sensibilização observada durante a adolescência é duradoura e pode influenciar a resposta à nicotina durante o desenvolvimento do animal.

Ainda considerando a hipótese de que mecanismos comuns medeiam a sensibilização comportamental, investigamos também se o pré-tratamento com anfetamina na adolescência poderia induzir sensibilização à nicotina na idade adulta.

Nos animais adultos, a injeção de anfetamina em animais pré-tratados com salina (SAL + ANF) também aumentou significativamente a locomoção nas doses de 2,5 e 5,0 mg/Kg. E ainda, nesses animais o pré-tratamento com nicotina na adolescência aumentou significativamente a locomoção induzida pela administração de 1,0 mg/Kg de anfetamina (NIC + ANF 1,0), comparando-se com os animais que receberam salina (SAL + ANF 1,0), evidenciando que a sensibilização cruzada verificada na adolescência permaneceu até a idade adulta, porém essa sensibilização foi revelada apenas com a menor dose utilizada. As doses de 2,5 e 5,0 mg/Kg podem produzir estereotipia no adulto, o que dificulta a avaliação da locomoção, isso pode não ocorrer no adolescente que apresenta menor resposta locomotora a psicostimulantes (Adriani & Laviola, 2000; Tirelli et al., 2003; Marin & Planeta, 2004).

Esses dados sugerem que as alterações promovidas pela nicotina na adolescência causam respostas comportamentais aumentadas a psicostimulantes até a idade adulta.

Embora a idade do animal no início do tratamento não esteja especificada, Schoffelmeer et al. (2002) mostraram que o pré-tratamento repetido com nicotina por cinco dias resulta em sensibilização cruzada aos efeitos sobre a atividade locomotora de uma única dose de 0,5 mg/Kg de anfetamina três

semanas depois do fim do tratamento. No mesmo sentido, Collins et al. (2004b) verificaram a sensibilização cruzada com anfetamina 30 dias após o fim do tratamento com nicotina. No nosso trabalho assim como no trabalho de Schoffemeer et al. (2002), foi utilizada uma única dose de anfetamina, diferente do trabalho de Collins et al. (2004b) em que foi utilizado o regime de dose cumulativa. Além disso, os animais de Schoffemeer et al. (2002) foram expostos apenas um dia à caixa de atividade enquanto os animais de Collins et al. (2004b) e os nossos tiveram mais de uma exposição ao ambiente experimental. Isso mostra que a sensibilização cruzada entre nicotina e anfetamina além de ser duradoura, é consistente, já que ela é evidenciada mesmo quando diferentes doses e metodologias são utilizados.

Nossos resultados mostraram a sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina e vice-versa tanto em animais adolescentes como em animais adultos pré-tratados na adolescência. Isso sugere que as neuroadaptações induzidas por essas drogas podem aumentar a resposta aos efeitos sobre a atividade locomotora uma da outra e que esse efeito pode ser observado até a vida adulta.

Mecanismos comuns medeiam a sensibilização comportamental à nicotina e à anfetamina. Um desses mecanismos é o aumento na concentração extracelular de dopamina no núcleo acumbens (Picciotto, 1998). A exposição repetida à nicotina e à anfetamina sensibiliza a liberação de dopamina nos terminais dopaminérgicos da área tegmental ventral que se projetam ao núcleo acumbens. Nos dois casos, a indução da sensibilização é promovida pela ação dessas substâncias na área tegmental ventral enquanto o núcleo acumbens é importante na expressão da sensibilização (Shim et al. 2001; Vezina, 2004). Além disso, foi demonstrado que na sensibilização comportamental à nicotina e à

anfetamina existem diferenças na concentração de dopamina liberada na concha e no centro do núcleo acumbens, sendo que para as duas substâncias a sensibilização na transmissão dopaminérgica ocorre no centro do núcleo acumbens (Cadoni et al., 2000; Cadoni e Di Chiara, 2000).

O aumento na concentração extracelular de dopamina no núcleo acumbens pode ocorrer também através de efeitos no transportador de dopamina. A anfetamina age diretamente nesse transportador fazendo o transporte reverso de dopamina na troca por anfetamina. A supersensibilidade desses transportadores parece estar relacionada à sensibilização induzida pela anfetamina (Shilling et al., 1997). A nicotina também pode modular indiretamente os transportadores de dopamina no estriado via ativação de receptores colinérgicos nicotínicos (Middleton et al., 2004). De fato, em adolescentes, o tratamento com nicotina promove o aumento da densidade de transportadores de dopamina enquanto causa a diminuição da densidade de transportadores de serotonina, e nenhuma mudança nas densidades de receptores colinérgicos nicotínicos e em receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ (Collins et al. 2004a).

Os aspectos moleculares da sensibilização podem estar relacionados com neuroadaptações que promovam a supersensibilidade da via adenilil-ciclase / AMPc / PKA (Nestler & Aghajanian, 1997). As modificações nessa via foram claramente demonstradas para os psicostimulantes. Contudo, o envolvimento da PKA na sensibilização à nicotina ainda é controverso. Assim, Cruz (2004) não observou alterações na PKA após dose de 0,4mg/Kg de nicotina. Por outro lado, Abreu-Villaça et al. (2003) demonstraram aumento na atividade da adenilil-ciclase induzido pela nicotina.

Mas a sensibilização cruzada entre nicotina e anfetamina pode decorrer de mecanismos mais complexos, como a interação das transmissões dopaminérgicas e colinérgicas. A dopamina e acetilcolina interagem no sistema dopaminérgico mesoestriatal. Interneurônios colinérgicos possuem ramificações axonais densas no estriado, além de possuírem receptores dopaminérgicos principalmente do tipo D₂ e D₅. Nas áreas dopaminérgicas os receptores colinérgicos nicotínicos são expressos tanto em neurônios dopaminérgicos como em gabaérgicos e pré-sinápticamente em aferências glutamatérgicas para essas áreas (Zhou et al., 2003).

Os receptores nicotínicos pré-sinápticos podem modular a liberação de dopamina no estriado (Wonnacott, 2000) e a nicotina age diretamente nesses receptores. O aumento da liberação de acetilcolina no estriado causado pela anfetamina é mediado por receptores dopaminérgicos (Keys & Mark, 1998) e se correlaciona com o perfil temporal da expressão da sensibilização comportamental à anfetamina (Bickerdike & Abercrombie, 1997). Como a sensibilização a psicostimulantes depende da ativação de receptores nicotínicos (Schoffelmeer et al., 2002), a interação entre dopamina e acetilcolina nas áreas estriatais pode ser outro mecanismo comum na sensibilização comportamental cruzada entre nicotina e anfetamina e vice-versa.

O desenvolvimento de modelos animais tem contribuído muito para a investigação e esclarecimento dos mecanismos neurais da dependência. Entretanto, a complexidade do fenômeno faz com que ainda sejam necessários muitos esforços para que esse mecanismo seja melhor compreendido e a partir daí tenhamos as bases para o desenvolvimento racional de medidas preventivas

e agentes terapêuticos que possam ser utilizados para esse grave problema em todo o mundo.

Nossos resultados sugerem que adolescentes que abusam de anfetamina ou nicotina podem ser particularmente suscetíveis aos efeitos da outra substância, e conseqüentemente mais vulneráveis a desenvolver dependência a essas drogas. Além disso, essa maior vulnerabilidade pode persistir durante o desenvolvimento até a vida adulta.

Estudos futuros são necessários para esclarecer os mecanismos neurais relacionados à sensibilização cruzada entre essas duas drogas.

7. CONCLUSÕES

- A administração de nicotina (0,4 mg/Kg s.c.) durante sete dias não promove sensibilização comportamental em ratos adolescentes.
- A administração de anfetamina (5,0 mg/Kg i.p.) durante sete dias promove sensibilização comportamental em ratos adolescentes.
- A administração aguda de nicotina (0,4 mg/Kg s.c.) após pré-tratamento com salina não altera a atividade locomotora em ratos adultos. Porém estimula a atividade em ratos adolescentes.
- A administração de 5,0 e 2,5 mg/Kg de anfetamina (i.p.) após pré-tratamento com salina aumenta a atividade locomotora em ratos adolescentes e adultos, mas não a dose de 1,0 mg/Kg.
- O pré-tratamento com anfetamina na adolescência aumenta significativamente a locomoção induzida por administração subsequente de nicotina em ratos adolescentes e adultos, evidenciando que ocorre a sensibilização cruzada entre anfetamina e nicotina na adolescência e que ela é duradoura.
- O pré-tratamento com nicotina na adolescência aumenta significativamente a locomoção induzida por administração subsequente de 5,0 mg/Kg de anfetamina em ratos adolescentes e de 1,0 mg/Kg em ratos adultos, evidenciando que ocorre a sensibilização cruzada entre nicotina e anfetamina na adolescência e que ela é duradoura, dependendo da dose de anfetamina utilizada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-VILLACA, Y.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Impact of adolescent nicotine exposure on adenylyl cyclase-mediated cell signaling: enzyme induction, neurotransmitter-specific effects, regional selectivities, and the role of withdrawal. **Brain Res**, v.988, p. 164-72,2003.

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G.A. Unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 334-46, 2000.

AIZENSTEIN, M.L.; SEGAL, D.S.; KUCZENSKY, R. Repeated amphetamine and fencamfamine: sensitization and reciprocal cross-sensitization. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.7, p.187-194, 1990.

ALCANTARA, L.M.A.; PLANETA, C.S.; DELUCIA, R. Envolvimento do sistema dopaminérgico na sensibilização comportamental ao femproporex. **Rev Ciênc Farm**, v.23 (1), p.59-70, 2002.

BELLUZZI, J.D.; LEE, A.G.; OLIFF, H.S.; LESLIE, F.M. Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.174(3), p.389-95, 2004.

BENWELL, M.E.M.; BALFOUR, D.J.K. The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. **Br J Pharmacol**, v.105, p. 849-856, 1992.

BERGMAN, J.; MADRAS, B.K.; JOHNSON, S.E.; SPEALMAN, R.D. Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys. **J Pharmacol Exp Ther** , v. 251(1), p. 150-5, 1989.

BICKERDIKE, M.J.; ABERCROMBIE, E.D. Striatal acetylcholine release correlates with behavioral sensitization in rats withdrawn from chronic amphetamine. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 282(2), p. 818-26, 1997.

BOLANOS, C.A.; GLATT, S.J.; JACKSON, D. Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 111, p. 25-33, 1998.

CADONI, C.; PISANU, A.; SOLINAS, M.; ACQUAS, E.; DI CHIARA, G. Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. **Psychopharmacology (Berl)**, v.158(3), p. 259-66, 2001.

CADONI, C.; Di CHIARA, G. Differential changes in accumbens shell and core dopamine in behavioral sensitization to nicotine. **Eur J Pharmacol**, v. 387, p. 23-25, 2000.

CADONI, C.; SOLINAS, M.; DI CHIARA, G. Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. **Eur J Pharmacol**, v. 388(1), p.69-76, 2000.

CALABRESI, P.; LACEY, M.G.; NORTH, R.A. Nicotinic excitation of rat ventral tegmental neurones in vitro studied by intracellular recording. **Br J Pharmacol**, v. 98(1), p.135-40, 1989.

CARLEZON Jr, W.A.; KONRADI, C. Understanding the neurobiological consequences of early exposure to psychotropic drugs: linking behavior with molecules. **Neuropharmacology** , v. 47, p.47-60, 2004.

CDC. The health consequences of smoking – a report of the surgeon general 2004. Disponível em http://www.cdc.gov/tobacco/sgr/sgr_2004/. Acesso em 28 de abril 2005.

CEBRID. IV Levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras – 1997. Disponível em <http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/estudantes/sintese.htm>. Acesso em 28 de abril 2005.

CICCOCIOPPO, R.; MARTIN-FARDON, R.; WEISS, F. Stimuli associated with a single cocaine experience elicit long-lasting cocaine seeking. **Nat Neurosci**, v.7, p. 495-496, 2004.

COLLINS, S.L.; IZENWASSER, S. Chronic nicotine differentially alters cocaine-induced locomotor activity in adolescent vs. adult male and female rats. **Neuropharmacology**, v.46, p. 349-362, 2004.

COLLINS, S.L.; WADE, D.; LEDON, J.; IZENWASSER, S. Neurochemical alterations produced by daily nicotine exposure in periadolescent vs. adult male rats. **Eur J Pharmacol**, v. 502, p. 75-85, 2004a.

COLLINS, S.L.; MONTANO, R.; IZENWASSER, S. Nicotine treatment produces persistent increases in amphetamine-stimulated locomotor activity in periadolescent male but not female or adult male rats. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 153, p. 175-187, 2004b.

COMMUNITY EPIDEMIOLOGY WORK GROUP. Epidemiologic trends in drug abuse - Advance Report. 2004. Disponível em: <http://www.drugabuse.gov/PDF/CEWG/AdvReport1203.pdf>. Acesso em: 28 de abril de 2005.

CORRIGALL, W. A.; FRANKLIN, K. B.; COEN, K. M.; CLARKE, P. B. The Mesolimbic Dopaminergic System Is Implicated in the Reinforcing Effects of Nicotine. **Psychopharmacology (Berl)**, v.107, p. 285-289, 1992.

COULTER, C.L.; HAPPE, H.K.; MURRIN, L.C. Postnatal development of the dopamine transporter: a quantitative autoradiographic study. **Brain Res Dev Brain Res**, v.92, p.172-81, 1996.

COVINGTON III, H.E.; MICZEK, K.A. Repeated social defeat stress or morphine: effects on behavioral sensitization and IV cocaine self-administration “binges”. **Psychopharmacology (Berl)**, v.158, p.388-98., 2001.

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

CRUZ F.C. **Sensibilização comportamental induzida pela nicotina - mecanismos moleculares e modificações pelo estresse em ratos adolescentes e adultos**. 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde UFSCAR, São Carlos, 2004.

DE ROVER, M.; MANSVELDER, H.D.; LODDER, J.C.; WARDEH, G.; SCHOFFELMEER, A.N.; BRUSSAARD, A.B. Long-lasting nicotinic modulation of

GABAergic synaptic transmission in the rat nucleus accumbens associated with behavioural sensitization to amphetamine. **Eur J Neurosci**, v. 19(10), p. 2859-70, 2004.

DI CHIARA G. Behavioural pharmacology and neurobiology of nicotine reward and dependence. In: Clemente, F., Fornasari D., Gotti C. (Eds) **Handbook of experimental pharmacology**, v. 144. Springer, Heidelberg, pp.603-750, 2000.

DOMINO, E.F. Nicotine induced behavioral locomotor sensitization. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.25, p.59-71, 2001.

FARADAY, M.M.; ELLIOTT, B.M.; PHILLIPS, J.M.; GRUNBERG, N.E. Adolescent and adult male rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, p. 917-931, 2003.

FARADAY, M.M.; ELLIOT, B.M.; GRUNBERG, N.E. Adult vs adolescent rats differ in biobehavior responses to chronic nicotine administration. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 70, p. 475-489, 2001.

FIEDLER, E.P.; MARKS, M.J.; COLLINS A.C. Postnatal development of two nicotinic cholinergic receptor in seven mouse brain regions. **Int J Dev Neurosci**, v. 8, p. 533-540, 1990.

FREDRIKSSON, A.; ERIKSSON, P.; ANKARBERG, E.; PALOMO, T.; ARCHER T. Neonatal nicotine administration influences ethanol-induced behaviors. **Alcohol**, v. 21(2), p. 107-115, 2000.

GAYTAN, O.; AL-RAHIM, S.; SWANN, A.; DAFNY, N. Sensitization to locomotor effects of methylphenidate in the rat. **Life Sci.**, v. 61(8) p. 101-7, 1997.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: Pergamon, 2001. 2148 p.

HANSON, G.R.; RAU, K.S.; FLECKENSTEIN, A.E. The methamphetamine experience: a NIDA partnership. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 92-100, 2004.

HENNINGFIELD, J.E.; CLAYTON, R.; POLLIN, W. Involvement of tobacco in alcoholism and illicit drug use. **Br J Addict**, v. 8, p. 279-292, 1990.

HORGER, B.A.; GILES, M.K.; SCHENK, S. Preexposure to amphetamine and nicotine predisposes rats to self-administer a low-dose of cocaine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 107, p. 271-276, 1992.

HYMAN, S.E. Addiction to cocaine and amphetamine. **Neuron**, v. 16, p. 901-904, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tabagismo: Dados e Números. Disponível em: www.inca.org.br/prevencao/tabagismo/dadosnum/index.html. Acesso em: 28 de abril de 2005.

JAFFE, J.H. Drug addiction and drug abuse. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (Eds.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 8th ed. New York: Pergamon, 1990. p. 523-573.

JONES, H.E.; GARRET, B.E.; GRIFFITHS R.R. Subjective and physiological effects of intravenous nicotine and cocaine in cigarette smoking cocaine abusers. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 288, p. 188-197, 1999.

KALIVAS, P.W.; DUFFY, P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of A10 dopamine neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, v.241, p.204-12, 1987.

KEYS, A.S.; MARK, G.P. D1 and D2 dopamine receptor mediation of amphetamine-induced acetylcholine release in nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 86(2), p. 521-31, 1998.

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p.97-129, 2001.

KOOB, G.F. Neural mechanisms of drug reinforcement. **Ann N Y Acad Sci**, v. 654, p. 171-191. 1992.

LAVIOLA, G.; ADRIANI, W.; TERRANOVA, M.L.; GERRA, G. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animals models. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, p. 993-1010, 1999.

LAVIOLA, G.; WOOD, R.D.; KUHN, C.; FRANCIS, R.; SPEAR, L.P. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. **J Pharmacol Exp Ther**, 275, 345 – 357. 1995.

LINDSAY, G.B.; RAINEY, J.; Psychological and pharmacological explanations of nicotine's "Gateway Drug" function. **J Sch Health**, v. 67, p. 123-126, 1997.

LUNA, G. C. Use and abuse of amphetamine-type stimulants in the United States of America. **Rev Panam Salud Publica**, v. 9(2), p. 114-22, 2001.

MARIN, M.T.; PLANETA, C.S. Maternal separation affects cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent, but not in adult rats. **Brain Res**, v. 1013, p. 83-90, 2004.

MARKS, M.J.; PAULY, J.R.; GROSS, S.D.; DENERIS, E.S.; HERMANS-BORGMEYER, I.; HEINEMAN, S.F.; COLLINS, A.C. Nicotine binding and nicotinic receptor subunit mRNA after chronic nicotine treatment. **J Neurosci**, v.12, p.2765-84, 1992.

MCGEHEE, D.S.; ROLE, L.W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 521-46, 1995.

MERIRINNE E, KANKAANPAA A, SEPPALA T. Rewarding properties of methylphenidate: sensitization by prior exposure to the drug and effects of dopamine D1- and D2-receptor antagonists. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 298(2), p. 539-50, 2001.

MIDDLETON, L.S.; CASS, W.A.; DWOSKIN, L.P. Nicotinic receptor modulation of dopamine transporter function in rat striatum and medial prefrontal cortex. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 308(1), p. 367-77, 2004.

MISERENDINO, M. J.; NESTLER, E. J. Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. **Brain Res**, v. 674, p. 299-306, 1995.

MOLL, G.H.; MEHNERT, C.; WICKER, M.; BOCK, N.; ROTHENBERGER, A.; RUTHER, E.; HUETHER G. Age-associated changes in the densities of presynaptic monoamine transporter in different regions of the rat brain from early juvenile life to late adulthood. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 119, p. 251-57, 2000.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E.; ROBERT, C. M. **Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience**. New York: McGraw-hill, 2001. 539p.

NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science**, v. 278, p. 58-63, 1997.

O'BRIEN, C.P. Drug addiction and abuse. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Eds). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: Pregamon, 2001. p. 621-642.

PHILLIPS, T.J.; ROBERBS, A.J.; LESSOV, C.N. Behavioral sensitization to ethanol: genetics and the effects of stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v.57, p. 487-93, 1997.

PICCIOTTO, M.R.; ZOLI, M.,LÉNA, C., MARUBIO, L.M. MERLO, E. P., FRUXE, K. CHANGEUX, J.P. Acetylcholine receptors containg the beta-2 subunit are involved in reforcing proprieties of nicotine. **Nature**. v.391, p. 173-177, 1998.

PICH, E.M.; PAGLIUSI, S.R.; TESSARI, M.; TALABOT-AYER, D.; VAN HUIJSDUIJNEN, R.H.; CHIAMULERA, C. Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. **Science**, v. 275, p. 83-86, 1997.

PLANETA, C.S.; MARIN, M.T. Effect of cocaine on periadolescent rats with or without early maternal separation. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 1367–1371. 2002.

PLANETA, C.S.; DELUCIA, R. Involvement of dopamine receptors in diethylpropion-induced conditioning place preference. **Braz J Med Biol Res**, v. 31(4), p. 561-4, 1998.

PONTIERI, F. E.; TANDA, G.; ORZI, F.; DI CHIARA, G. Effects of nicotine on the nucleus acumbens and similarity to those of addictive drugs. **Nature**, v. 382, p. 255-257, 1996.

POST, R. M.; CONTEL, N. R. Human and animal studies of cocaine: implications of development of behavioral pathology. In CREESE, I. (Ed.). **Stimulantants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives**. New York:Raven, 1983. p. 169-203.

POWEL, K.R.; HOLTZMAN, S.G. Parametric evaluation of the development of sensitization to the effects of morphine on locomotor activity. **Drug Alcohol Depend**, v.62, p.83-90, 2001.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction**, v.96, p.103-114, 2001.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. **Addiction**, v.95, p.S91-117, 2000.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 18, p. 247-291, 1993.

ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 396, p. 157-198, 1986.

ROLL, J.M.; HIGGINS, S.T.; BUNDEY, A.J.; BICKEL, W.K.; BADGER, G.J. A comparison of cocaine-dependent cigarette smokers and non-smokers on demographics, drug use and other characteristics. **Drug Alcohol Depend**, v. 40, p. 195-201, 1996.

ROSENBERG, D.R.; LEWIS, D.A. Postnatal maturation of the dopaminergic innervation of monkey prefrontal and motor cortices: a tyrosine hydroxylase immunohistochemical analysis. **J Comp Neurol**, v. 358, p. 383-400, 1995.

SANTOS, G. C.; JUSTO, C. C.; DELUCIA, R.; PLANETA, C. S. **Sensibilização cruzada entre femproporex e nicotina em ratos adolescentes e adultos**. XX Reunião anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental. 2005 (Painel aceito para apresentação).

SCHAMBRA, U.B.; DUNCAN, G.E.; BREESE, G.R.; FORNARETTO, M.G.; CARON, M.G.; FREMEAU, R.T.J. Ontogeny of D1 and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. **Neuroscience**, v. 62, p. 65-85, 1994.

SCHOCHET, T.L.; KELLEY, A. E.; LANDRY, C.F. Differential behavioral effects of nicotine exposure in adolescent and adult rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 175, p. 265–273, 2004.

SCHOFFELMEER, A.N.; DE VRIES, T.J.; WARDEH, G.; VAN DE VEN, H.W.; VANDERSCHUREN, L.J. Psychostimulant-induced behavioral sensitization depends on nicotinic receptor activation. **J Neurosci**, v. 22, p. 3269-76, 2002.

SCHORLING, J.B.; GUTGESELL, M.; KLAS, P.; SMITH, D.; KELLER, A. Tobacco, alcohol and other drug use among college students. **J Subst Abuse**, v. 6, p. 105-111, 1994.

SHILLING, P.D.; KELSOE, J.R.; SEGAL, D.S. Dopamine transporter mRNA is up-regulated in the substantia nigra and the ventral tegmental area of amphetamine-sensitized rats. **Neurosci Lett**, v.236, p. 131-4, 1997.

SHIM, I.; JAVAID, J. I.; WIRTSHAFTER, D. JANG, S. Y.; SHIN, K. H.; LEE, H. J.; CHUNG, Y. C.; CHUN, B. G. Nicotine-induced behavioral sensitization is associated with extracellular dopamine release and expression of c-FOS in the

striatum and nucleus accumbens of the rat. **Behav Brain Res**, v. 121, p. 137-147, 2001.

SHUSTER, L.; HUDSON, J.; ANTON, M.; RIGHI, D. Sensitization of mice to methylphenidate. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 77, p. 31-6, 1982.

SILVA, O.A.; YONAMINE, M. Drug abuse among workers in Brazilian regions. **Rev Panam Salud Publica**, v. 38, p. 552-6, 2004.

SMITH, B.R.; HORAN, J.T.; GASKIN, S.; AMIT, Z. Exposure to nicotine enhances acquisition of ethanol drinking by laboratory rats in a limited access paradigm. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 142, p. 408-12, 1999.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, p. 417-463, 2000.

STOLERMAN, I.P; JARVIS, M.J. - The Scientific Case that Nicotine Is Addictive. **Psychopharmacology (Berl)**, v.117, p. 2-10, 1995.

SUEMARU, K.; GOMITA, Y.; FURUNO, K.; ARAKI, Y. Chronic nicotine treatment potentiates behavioral responses to dopaminergic drugs in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 46, p. 135-9, 1993.

TORRÃO, A. S.; BRITTO, L.R.G. Neurotransmitter regulation of neural development: acetylcholine and nicotinic receptors. **An Acad Bras Cienc**, v. 74, p. 453-461, 2002.

TEICHER, M.H.; ANDESEN, S.L.; HOSTETTER Jr., J.C. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 89, p167-172, 1995.

TIRELLI, E.; LAVIOLA, G.; ADRIANI, W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, p. 163-78, 2003.

VANDERSCHUREN, L.J.M.J.; SCHOFFELMEER, A.N.M.; MULDER, A.H.; DE VRIES T.J. Dopaminergic mechanisms mediating the long-term expression of locomotor sensitization following pre-exposure to morphine or amphetamine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 143, p. 244-253, 1999.

VASTOLA, B.J.; DOUGLAS, L.A.; VARLINSKAYA, E.I.; SPEAR, L.P. Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rats. **Physiol Behav**, v. 77, p. 107-114, 2002.

VEZINA, P. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27 p. 827-39, 2004

VEZINA, P.; QUEEN, A.L. Induction of locomotor sensitization by amphetamine requires the activation of NMDA receptors in the rat ventral tegmental area. **Psychopharmacology (Berl)**, v.151, p.184-91, 2000.

VOLKOW, N.D. **The role of dopamine system in addiction.** New understanding of drug addiction – a special report. New York: McGraw-Hill, 1997. pp. 22-26.

WISE, R.A.; BOZARTH, M.A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol Rev**, v.94, p.469-92, 1987.

WONNACOTT, S.; KAISER, S.; MOGG, A.; SOLIAKOV, L.; JONES, I.W. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. **Eur J Pharmacol**, v. 393, p. 51-8, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Statistical classification of diseases and related health problems. Geneva: Who, 1992.

YANG, P.B.; SWANN, A.C.; DAFNY, N. Chronic pretreatment with methylphenidate induces cross-sensitization with amphetamine. **Life Sci**, v. 73, p. 2899-911, 2003.

ZHOU, F.M.; WILSON, C.; DANI, J.A. Muscarinic and nicotinic cholinergic mechanisms in the mesostriatal dopamine systems. **Neuroscientist**, v. 9, p. 23-36, 2003.

ANEXO: ESTATÍSTICA COMPLETA

Comparações entre os pares de média pelo teste F

1. Sensibilização comportamental à nicotina em animais adolescentes

GRUPOS	0-15 minutos	15-30 minutos
SAL + SAL vs SAL + NIC	F(1,20) = 16,49; p<0,001	F(1,20) = 6,90; p<0,05
SAL + NIC vs NIC + NIC	F(1,20) = 1,41; p=0,25	F(1,20) = 0,13; p=0,72
SAL + SAL vs NIC + NIC	F(1,20) = 27,11; p<0,001	F(1,20) = 5,17; p<0,05

2. Sensibilização comportamental à anfetamina em animais adolescentes

GRUPOS	0-15 minutos	15-30 minutos	30-45 minutos
SAL + SAL vs SAL + ANF	F(1,19) = 0,15; p=0,70	F(1,19) = 8,57; p<0,01	F(1,19) = 7,23; p<0,05
SAL + ANF vs ANF + ANF	F(1,19) = 3,94; p=0,06	F(1,19) = 5,08; p<0,05	F(1,19) = 2,68; p=0,12
SAL + SAL vs ANF + ANF	F(1,19) = 2,10; p=0,16	F(1,19) = 23,14; p<0,001	F(1,19) = 17,68; p<0,001

3. Locomoção induzida pela nicotina em animais adolescentes pré-tratados com anfetamina

GRUPOS	0-15 minutos	15-30 minutos
SAL + SAL vs SAL NIC	Dia 10: F(1,22) = 10,75; p<0,01	Dia 10: F(1,22) = 0,12; p=0,73
	Dia 17: F(1,22) = 18,10; p<0,001	Dia 17: F(1,22) = 12,85; p<0,01

SAL + NIC vs ANF + NIC	Dia 10: $F(1,22) = 7,26$; $p < 0,05$	Dia 10: $F(1,22) = 3,27$; $p = 0,08$
	Dia 17: $F(1,22) = 0,66$; $p = 0,42$	Dia 17: $F(1,22) = 2,38$; $p = 0,14$
SAL + SAL vs ANF + SAL	Dia 10: $F(1,22) = 0,51$; $p = 0,48$	Dia 10: $F(1,22) = 3,11$; $p = 0,09$
	Dia 17: $F(1,22) = 0,0057$; $p = 0,94$	Dia 17: $F(1,22) = 0,50$; $p = 0,49$
SAL + SAL vs ANF + NIC	Dia 10: $F(1,22) = 42,82$; $p < 0,001$	Dia 10: $F(1,22) = 2,57$; $p = 0,12$
	Dia 17: $F(1,22) = 14,21$; $p < 0,005$	Dia 17: $F(1,22) = 4,99$; $p < 0,05$
ANF + SAL vs SAL + NIC	Dia 10: $F(1,22) = 15,45$; $p < 0,001$	Dia 10: $F(1,22) = 1,60$; $p = 0,22$
	Dia 17: $F(1,22) = 18,69$; $p < 0,001$	Dia 17: $F(1,22) = 17,89$; $p < 0,001$
ANF + SAL vs ANF + NIC	Dia 10: $F(1,22) = 52,67$; $p < 0,001$	Dia 10: $F(1,22) = 11,35$; $p < 0,005$
	Dia 17: $F(1,22) = 14,78$; $p < 0,001$	Dia 17: $F(1,22) = 8,65$; $p < 0,01$

4. Locomoção induzida pela nicotina em animais adultos pré-tratados com anfetamina na adolescência

GRUPOS	0-15 minutos	15-30 minutos
SAL + NIC vs ANF + NIC	$F(1,26) = 2,44$; $p = 0,13$	$F(1,26) = 2,39$; $p = 0,13$
SAL + SAL vs SAL + NIC	$F(1,26) = 0,92$; $p = 0,35$	$F(1,26) = 2,99$; $p = 0,10$
SAL + SAL vs ANF + SAL	$F(1,26) = 0,06$; $p = 0,81$	$F(1,26) = 0,0017$; $p = 0,97$
SAL + SAL vs ANF + NIC	$F(1,26) = 7,43$; $p < 0,05$	$F(1,26) = 12,53$; $p < 0,01$
ANF + SAL vs SAL + NIC	$F(1,26) = 1,41$; $p = 0,24$	$F(1,26) = 2,86$; $p = 0,10$
ANF + SAL vs ANF + NIC	$F(1,26) = 8,84$; $p < 0,01$	$F(1,26) = 12,25$; $p < 0,01$

5. Locomoção induzida pela anfetamina em animais adolescentes pré-tratados com nicotina

GRUPOS	0-15 minutos	15-30 minutos	30-45 minutos
SAL + SAL NIC + SAL	Dia 10: F(1,67) = 0,61; p=0,44	Dia 10: F(1,67) = 0,02; p=0,89	Dia 10: F(1,67) = 0,008; p=0,93
	Dia 17: F(1,67) = 0,41; p=0,52	Dia 17: F(1,67) = 0,04; p=0,84	Dia 17: F(1,67) = 0,0001; p=0,99
SAL + SAL SAL+ANF 5,0	Dia 10: F(1,67) = 7,71; p<0,01	Dia 10: F(1,67) = 41,2; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 40,7; p<0,001
	Dia 17: F(1,67) = 51,1; p<0,001	Dia 17: F(1,67) = 13,6; p<0,001	Dia 17: F(1,67) = 10,2; p<0,001
SAL + SAL NIC+ANF 5,0	Dia 10: F(1,67) = 26,6; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 68,2; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 54,6; p<0,001
	Dia 17: F(1,67) = 108,0; p<0,001	Dia 17: F(1,67) = 47,1; p<0,001	Dia 17: F(1,67) = 34,7; p<0,001
SAL + SAL SAL+ANF 2,5	Dia 10: F(1,67) = 4,63; p<0,05	Dia 10: F(1,67) = 22,4; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 21,6; p<0,001
	Dia 17: F(1,67) = 13,8; p<0,001	Dia 17: F(1,67) = 8,36; p<0,01	Dia 17: F(1,67) = 11,4; p<0,01
SAL + SAL NIC+ANF 2,5	Dia 10: F(1,67) = 9,31; p<0,005	Dia 10: F(1,67) = 22,0; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 19,5; p<0,001
	Dia 17: F(1,67) = 4,21; p<0,05	Dia 17: F(1,67) = 6,37; p<0,05	Dia 17: F(1,67) = 9,16; p<0,01
SAL + SAL SAL+ANF 1,0	Dia 10: F(1,67) = 0,05; p=0,83	Dia 10: F(1,67) = 2,57; p=0,11	Dia 10: F(1,67) = 1,27; p=0,26
	Dia 17: F(1,67) = 0,29; p=0,59	Dia 17: F(1,67) = 1,76; p=0,19	Dia 17: F(1,67) = 1,14; p=0,29
SAL + SAL NIC+ANF 1,0	Dia 10: F(1,67) = 0,18; p=0,67	Dia 10: F(1,67) = 2,44; p=0,12	Dia 10: F(1,67) = 0,71; p=0,40
	Dia 17: F(1,67) = 2,76; p=0,10	Dia 17: F(1,67) = 2,51; p=0,12	Dia 17: F(1,67) = 1,04; p=0,31

NIC + SAL SAL+ANF 5,0	Dia 10: F(1,67) = 4,50; p<0,05	Dia 10: F(1,67) = 39,7; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 39,7; p<0,001
	Dia 17: F(1,67) = 43,7; p<0,001	Dia 17: F(1,67) = 12,4; p<0,001	Dia 17: F(1,67) = 10,2; p<0,01
NIC + SAL NIC+ANF 5,0	Dia 10: F(1,67) = 20,0; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 66,2; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 53,4; p<0,001
	Dia 17: F(1,67) = 96,7; p<0,001	Dia 17: F(1,67) = 44,6; p<0,001	Dia 17: F(1,67) = 34,6; p<0,001
NIC + SAL SAL+ANF 2,5	Dia 10: F(1,67) = 2,16; p=0,15	Dia 10: F(1,67) = 21,2; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 20,9; p<0,001
	Dia 17: F(1,67) = 9,92; p<0,005	Dia 17: F(1,67) = 7,35; p<0,01	Dia 17: F(1,67) = 11,3; p<0,005
NIC + SAL NIC+ANF 2,5	Dia 10: F(1,67) = 5,61; p<0,05	Dia 10: F(1,67) = 20,9; p<0,001	Dia 10: F(1,67) = 18,8; p<0,001
	Dia 17: F(1,67) = 2,23; p=0,14	Dia 17: F(1,67) = 5,50; p<0,05	Dia 17: F(1,67) = 9,11; p<0,005
NIC + SAL SAL+ANF 1,0	Dia 10: F(1,67) = 0,86; p=0,36	Dia 10: F(1,67) = 2,18; p=0,14	Dia 10: F(1,67) = 1,10; p=0,30
	Dia 17: F(1,67) = 0,002; p=0,97	Dia 17: F(1,67) = 1,30; p=0,26	Dia 17: F(1,67) = 1,12; p=0,29
NIC + SAL NIC+ANF 1,0	Dia 10: F(1,67) = 0,08; p=0,78	Dia 10: F(1,67) = 2,06; p=0,16	Dia 10: F(1,67) = 0,58; p=0,45
	Dia 17: F(1,67) = 1,17; p=0,28	Dia 17: F(1,67) = 1,95; p=0,17	Dia 17: F(1,67) = 1,02; p=0,32
SAL+ANF 5,0 NIC+ANF 5,0	Dia 10: F(1,67) = 3,86; p<0,05	Dia 10: F(1,67) = 1,84; p=0,18	Dia 10: F(1,67) = 0,40; p=0,53
	Dia 17: F(1,67) = 6,50; p<0,05	Dia 17: F(1,67) = 6,84; p<0,05	Dia 17: F(1,67) = 4,90; p<0,05
SAL+ANF 2,5 NIC+ANF 2,5	Dia 10: F(1,67) = 0,65; p=0,42	Dia 10: F(1,67) = 0,001; p=0,97	Dia 10: F(1,67) = 0,05; p=0,83
	Dia 17: F(1,67) = 2,22; p=0,14	Dia 17: F(1,67) = 0,11; p=0,74	Dia 17: F(1,67) = 0,10; p=0,74

SAL+ANF 1,0 NIC+ANF 1,0	Dia 10: F(1,67) = 0,35; p=0,56	Dia 10: F(1,67) = 0,001; p=0,97	Dia 10: F(1,67) = 0,07; p=0,79
	Dia 17: F(1,67) = 1,07; p=0,30	Dia 17: F(1,67) = 0,06; p=0,81	Dia 17: F(1,67) = 0,002; p=0,97

6. Locomoção induzida pela anfetamina em animais adultos pré-tratados com nicotina na adolescência

GRUPOS	0-15 minutos	15-30 minutos	30-45 minutos
SAL + SAL vs NIC + SAL	F(1,75) = 0,003; p=0,96	F(1,75) = 0,0009; p=0,98	F(1,75) = 0,002; p<0,97
SAL + SAL vs SAL + ANF 5,0	F(1,75) = 20,9; p<0,001	F(1,75) = 17,6; p<0,001	F(1,75) = 17,1; p<0,001
SAL + SAL vs NIC + ANF 5,0	F(1,75) = 35,9; p<0,001	F(1,75) = 30,1; p<0,001	F(1,75) = 21,7; p<0,001
SAL + SAL vs SAL + ANF 2,5	F(1,75) = 48,0; p<0,001	F(1,75) = 53,5; p<0,001	F(1,75) = 47,1; p<0,001
SAL + SAL vs NIC + ANF 2,5	F(1,75) = 38,4; p<0,001	F(1,75) = 35,6; p<0,001	F(1,75) = 29,3; p<0,001
SAL + SAL vs SAL + ANF 1,0	F(1,75) = 1,36; p=0,25	F(1,75) = 2,48; p=0,12	F(1,75) = 1,13; p=0,29
SAL + SAL vs NIC + ANF 1,0	F(1,75) = 21,6; p<0,001	F(1,75) = 23,1; p<0,001	F(1,75) = 9,70; p<0,005
NIC + SAL vs SAL + ANF 5,0	F(1,75) = 19,4; p<0,001	F(1,75) = 16,5; p<0,001	F(1,75) = 16,0; p<0,001
NIC + SAL vs NIC + ANF 5,0	F(1,75) = 33,6; p<0,001	F(1,75) = 28,3; p<0,001	F(1,75) = 20,3; p<0,001
NIC + SAL vs SAL + ANF 2,5	F(1,75) = 44,5; p<0,001	F(1,75) = 50,0; p<0,001	F(1,75) = 43,9; p<0,001
NIC + SAL vs NIC + ANF 2,5	F(1,75) = 35,7; p<0,001	F(1,75) = 33,3; p<0,001	F(1,75) = 27,3; p<0,001

NIC + SAL vs SAL + ANF 1,0	F(1,75) = 1,18; p=0,28	F(1,75) = 2,25; p=0,14	F(1,75) = 1,00; p=0,32
NIC + SAL vs NIC + ANF 1,0	F(1,75) = 20,0; p<0,001	F(1,75) = 21,5; p<0,001	F(1,75) = 8,90; p<0,005
SAL + ANF 5,0 vs NIC + ANF 5,0	F(1,75) = 1,56; p=0,22	F(1,75) = 1,28; p=0,26	F(1,75) = 0,21; p=0,65
SAL + ANF 2,5 vs NIC + ANF 2,5	F(1,75) = 0,22; p=0,64	F(1,75) = 1,05; p=0,31	F(1,75) = 1,28; p=0,26
SAL + ANF 1,0 vs NIC + ANF 1,0	F(1,75) = 10,1; p<0,005	F(1,75) = 8,70; p<0,005	F(1,75) = 3,50; p=0,06