

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA  
TOXICOLÓGICA**

**ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E DA  
PORFOBILINOGENO-SINTASE E ALTERAÇÃO  
COMPORTAMENTAL DE RATOS EXPOSTOS À  
NICOTINA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ALINE SEGATTO JOSÊ**

**SANTA MARIA, RS, BRASIL**

**2007**

**ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E DA  
PORFOBILINOGENO-SINTASE E ALTERAÇÃO  
COMPORTAMENTAL DE RATOS EXPOSTOS À NICOTINA**

por

**Aline Segatto José**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Ester Pereira

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE E DA  
PORFOBILINOGENO-SINTASE E ALTERAÇÃO  
COMPORTAMENTAL DE RATOS EXPOSTOS À NICOTINA**

elaborada por  
**Aline Segatto José**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Ester Pereira**  
(Presidente/Orientador)

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Carlos Fernando Mello (UFSM)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Maribel Antonello Rubin (UFSM)**

Santa Maria, 16 de março de 2007.

**“A felicidade não está em viver, mas em saber viver.  
Não vive mais o que vive, mas o que melhor vive”**

**Mahatma Gandhi**

**“Para minha mãe com todo meu amor”**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, por ter dedicado à vida a mim e meu irmão, por ser este exemplo de mulher, pela paciência e tranquilidade e por sempre ter acreditado em mim, muitas vezes mais do que eu mesma.

Ao meu irmão agradeço por todo o auxílio nos momentos difíceis, por estar sempre disponível e ao meu lado, mas agradeço principalmente por ser meu irmão.

Agradeço a professora Ester pela oportunidade de realizar este trabalho e por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

Aos colegas de laboratório: Nilce, Fabiane, Micheli, Carina, Luiz, Lucélia, Tania, Fernanda, Naglezi, Taíse, Livia e Marina, por dividirem os dias comigo, pelo auxílio prestado, pelos momentos de aprendizado, pela descontração, enfim, pela amizade.

Aos meus amigos-irmãos: Vivian, Maísa, Fabiane, Fabiana, Keli, Liliane, Patricia e Luis Fernando pelos inesquecíveis momentos de descontração, conselhos e principalmente pelo apoio em todos os momentos. Agradeço a Deus por ter vocês em minha vida, vocês são a família que pude escolher.

Aos amigos: Mauro, Talissa, Marcelo “Macaco”, Clauson “Batata” e Alex, pelos momentos de alegria e por fazerem parte da minha vida. Tenham certeza, vocês a tornam muito mais alegre.

Aos professores do curso pelo aprendizado e por contribuírem com minha formação.

As secretárias Angélica e Márcia por todo auxílio prestado.

A CAPES pela bolsa concedida.

A Deus pela minha vida.

**RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

**ATIVIDADE DA ACETILCOLINSTERASE E DA PORFOBILINOGÊNIO-SINTASE  
E ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS EXPOSTOS À NICOTINA**

Autora: ALINE SEGATTO JOSÉ

Orientadora: MARIA ESTER PEREIRA

Data e local de Defesa: Santa Maria, 16 de março de 2007.

A principal fonte de exposição à nicotina é o hábito de fumar e as terapias de substituição a ele. O hábito de fumar frequentemente se inicia na adolescência e a exposição à nicotina durante esta fase da vida produz alterações a longo prazo, aumentando a replicação e diferenciação celular, assim como também a apoptose. Alguns estudos relatam que a nicotina reduz, enquanto outros sugerem que este alcalóide não afeta o peso corporal. Também há controvérsias em relação à sua ação sobre a glicemia, secreção de insulina, tolerância à glicose e sobre a atividade de algumas enzimas consideradas marcadores de exposição a tóxicos, como a porfobilinogênio-sintase e a acetilcolinesterase. Entre os efeitos benéficos da nicotina, tem sido descrita a melhora do desempenho cognitivo em humanos e roedores, principalmente em relação à atenção e ao aprendizado.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da exposição à nicotina sobre alguns parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais. Os animais receberam, a partir do 30º dia de vida, 5 injeções diárias (s.c., 1 ml/kg de peso) de salina (0,9%) ou nicotina (dose total: 5 mg/kg/dia) aplicadas durante o período escuro do ciclo (8, 10, 12, 14, 16:00 h) por um período de 28 ou 56 dias. Foram analisados: atividade das enzimas acetilcolinesterase sanguínea e cerebral e porfobilinogênio-sintase sanguínea e hepática, níveis de glicogênio hepático e glicose sanguínea, e o comportamento de ratos em um campo aberto. Os animais foram mortos 90 min após a última dose, os tecidos foram coletados e preparados de acordo com as análises subseqüentes.

Os animais expostos à nicotina apresentaram um decréscimo do ganho de peso corporal (aos 28 e 56 dias) e do peso de fígado (aos 56 dias), uma redução dos níveis de glicogênio hepático, mas não da glicemia, em ambos os intervalos de tratamento. Esta diferença de efeitos sugere que a diminuição dos níveis de

glicogênio não foi suficiente para induzir uma hipoglicemia, até porque estes parâmetros foram analisados no estado absorptivo. As atividades das enzimas porfobilinogênio-sintase de sangue e fígado, assim como a acetilcolinesterase sanguínea não foram afetadas pelo tratamento em nenhum dos intervalos estudados. Similarmente, ausência de efeito da nicotina foi observada sobre a atividade da acetilcolinesterase de cérebro total, hipocampo e córtex de animais tratados por 28 dias; e, sobre as frações, solúvel em sal (enriquecida com a forma globular G1) e em detergente (enriquecida na forma globular G4) destas estruturas de animais expostos por 56 dias.

Na tarefa comportamental, os ratos tratados com nicotina apresentaram número de respostas de orientação e de cruzamento similares nas duas sessões, o que sugere que estes não habituaram ao ambiente. Entretanto, apresentaram resultados similares aos controles no tempo de saída da primeira área e no número de bolos fecais. Como o comportamento fóbico não foi alterado, podemos sugerir que os ratos jovens expostos à nicotina apresentam um prejuízo na memória de habituação.

Os resultados do presente estudo sugerem que os efeitos da nicotina parecem ser muito específicos, prejudicando o crescimento e o armazenamento de energia na forma de glicogênio e a habituação a um campo aberto, porém não interferindo na respostas de marcadores sensíveis a diversos agentes tóxicos, como a atividade da acetilcolinesterase e da PBG-sintase.

Palavras-chave: nicotina, acetilcolinesterase, porfobilinogênio-sintase, glicose, glicogênio, ratos jovens.



**ABSTRACT**

Master Dissertation  
Graduation Program in Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**ACTIVITIES OF ACETYLCHOLINESTERASE AND PORPHOBILINOGEN-SYNTASE AND BEHAVIORAL ALTERATION OF RATS EXPOSED TO NICOTINE**

Author: ALINE SEGATTO JOSÉ  
Advisor: MARIA ESTER PEREIRA

Date and place of the defense: Santa Maria, March, 16<sup>th</sup>, 2007.

Tobacco smoking and nicotine replacement therapy are the main form of nicotine exposure. The drug abuse for humans often begins during adolescence and the exposure to nicotine during this phase produces long-term alterations, such as increase in cell replication and differentiation, and apoptosis. Some studies have reported that nicotine exerts important inhibitory actions on eating and body weight gain in humans and animals. However, there are also studies showing that this alkaloid does not alter body weight gain. Contradictory results have also been reported about the actions of nicotine on glycemia, insulin secretion, and glucose tolerance and on the activity of some enzymes, such as porphobilinogen-synthase and acetylcholinesterase. Among the beneficial effects of nicotine, it has been reported that nicotine improves cognitive performance, mainly by increasing attention and learning.

The aim of this study was to investigate the effects of nicotine exposure on some biochemical, physiological and behavioral parameters. The animals received since the 30<sup>o</sup> day of life, 5 injections per day (s.c., 1 ml/ kg weight) of saline (0.9%) or nicotine (total dose: 5 mg/kg/day) applied during the dark period of the cycle (8, 10, 12, 14, 16:00 h) for 28 or 56 days. We analyzed acetylcholinesterase and porphobilinogen-synthase activities, hepatic glycogen and glucose levels and the rats behavior on an open field task at 21 days of treatment. The animals were killed 90 min after the last injection and the tissues were collected and prepared to posterior analyses.

The animals exposed to nicotine presented a decrease in body weight gain (at 28 and 56 days) and liver weight (at 56 days), a reduction on the liver glycogen levels but not glucose for both intervals of treatment. This difference of effects

suggests that the decrease in liver glycogen levels were not enough to produce a hypoglycemia, once these parameters were analyzed when the animals were fed. The activities of the enzymes porphobilinogen-synthase from blood and liver and blood acetylcholinesterase were not affected by nicotine treatment. Nicotine also did not affect hippocampal and cerebral cortex acetylcholinesterase activities in animals injected with nicotine for 28 days. The salt (predominantly G1 form) and detergent (mostly G4 form) fractions showed not be affect for the treatment with nicotine for 56 days.

The rats treated with nicotine presented similar number of rearing and crossings in both sessions of the open filed task suggesting that they did not habituate to a new environment. However, they presented similar scores of control group on the latency time and number of fecal boluses. As the phobic behavior was not altered, we can suggest that nicotine adolescent rats present impairment of habituation memory,

The results of the present study show that nicotine effects are very specific, impairing the weight gain, energy storage in glycogen form and habituation to a new environment, however not interfere in the acetylcholinesterase and porphobilinogen-synthase activities.

Keywords: nicotine, acetylcholinesterase, porphobilinogen-synthase, glucose, glycogen, young rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 01 – <i>Nicotiana tabacum</i> .....	19
FIGURA 02 – Estrutura química da nicotina.....	19
FIGURA 03 – Principais metabólitos da nicotina.....	23
FIGURA 04 – Estrutura química da acetilcolina.....	28
FIGURA 05 – Isoformas da AChE.....	31
FIGURA 06 – Sítio catalítico da AChE .....	32
FIGURA 07 – Síntese de porfobilinogênio.....	33
FIGURA 08 – Via biossintética do grupo heme.....	34

### MANUSCRITO I

FIGURE 01 – Plasma glucose and hepatic glycogen levels of rats treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) for a period of 28 or 56 days. ....	48
FIGURE 02 - Blood and hepatic PBG-synthase activities of rats treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) for a period of 28 or 56 days. ....	49
FIGURE 03 – Blood AChE activities of rats treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) for a period of 28 or 56 days.....	50

### MANUSCRITO II

FIGURE 1. Body weight gain of rats treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) for 28 days.....	70
FIGURE 2. Number of rearing (A) and crossings (B) of rats treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) submitted to two sessions in an open field task.....	71

FIGURE 3. Latency to leave the initial area (A) and number of fecal boluses (B) of rats treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) submitted to two sessions in an open field task. ....72

FIGURE 4. AChE activities from total brain, hippocampus and cerebral cortex of rats treated with saline 0.9% or nicotine 5 mg/kg/day for 28 days.....73

FIGURE 5. AChE activities from hippocampus (A) cerebral cortex fractions (B) of rats treated with saline 0.9% or nicotine 5 mg/kg/day for 56 days. ....74

## **LISTA DE TABELAS**

MANUSCRITO I:

TABLE 1 – Body, brain and liver weights of rats exposed to saline 0.9% or nicotine (5 mg/kg/day) for a period of 28 or 56 days.....47

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Objetivos</b> .....	18
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
<b>2.1 Nicotina</b> .....	19
2.1.1 Absorção.....	20
2.1.2 Distribuição tecidual de nicotina.....	21
2.1.3 Metabolismo.....	22
2.1.4 Excreção .....	23
2.1.5 Farmacodinâmica.....	24
2.1.6 Dependência, tolerância e abstinência.....	25
2.1.7 Efeitos fisiológicos e bioquímicos da nicotina .....	25
<b>2.2 Sistema Colinérgico</b> .....	28
2.2.1 Colinesterases .....	29
2.2.2 Acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7).....	29
2.2.3 Estrutura da acetilcolinesterase.....	30
2.2.4 Mecanismo de ação.....	31
<b>2.3 Porfobilinogênio–Sintase (E.C.4.2.1.24)</b> .....	33
<b>3. RESULTADOS</b> .....	36
<b>3.1 Manuscrito I:</b> Sensitivity of young rats to nicotine exposure: physiologic and biochemical parameters .....	36
<b>3.2 Manuscrito II:</b> Long-term nicotine exposure modifies behavior of rats in the open field but does not alter cerebral acetylcholinesterase .....	58
<b>4. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	82
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	85
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	86

## **Apresentação**

A dissertação está apresentada na seguinte forma: introdução, objetivos, revisão da literatura, resultados, discussão e conclusões. Os resultados estão na forma de manuscritos, os quais estão em fase de preparação, e foram escritos segundo as normas das revistas aos quais serão submetidos. A discussão e as conclusões referem-se à análise geral dos dois manuscritos. As referências bibliográficas, encontradas no final da dissertação, referem-se às citações que aparecem nos itens introdução, revisão da literatura e discussão.

## 1. INTRODUÇÃO:

A nicotina [1-metil-2-(3-piridil) pirrolidina] é um alcalóide natural encontrado em uma ampla variedade de plantas (DOOLITTLE et al., 1995). É uma amina composta de anéis piridina e pirrolidina (SCHEVELBEIN, 1982). A principal fonte de exposição à nicotina é através do tabaco e das terapias de substituição a ele, como adesivos transdérmicos e gomas que contêm o alcalóide (HEISHEMAN et al., 1994).

A nicotina é uma base fraca, desta forma a sua taxa de absorção através das membranas biológicas é um processo dependente do pH (SCHEVELBEIN, 1973 *apud* YILDIZ, 2004). Sua absorção aumenta quando o pH da solução torna-se mais básico e diminui quando o pH torna-se ácido, em função disto, a absorção através do trato gastrintestinal é pobre (YILDIZ, 2004). Depois de absorvida, a nicotina entra na circulação sendo distribuída para diversos tecidos, incluindo o cérebro (ZEVIN et al., 1998). É extensivamente metabolizada pelo fígado em um grande número de metabólitos, sendo a cotinina o principal deles (CASHMAN et al., 1992).

Entre os efeitos benéficos da nicotina sobre o desempenho cognitivo humano, os achados mais consistentes têm sido sobre a atenção (STOLERMAN et al., 1995). Entretanto, em ratos tratados agudamente pode causar efeito sobre a atividade locomotora, inicialmente causando uma supressão. Já a administração crônica tende a estimular a atividade locomotora (BEVINS & BRESHEER, 2000). Em modelos animais a nicotina induz uma melhora cognitiva, observada claramente em termos de desempenho da memória (LEVIN & SIMON, 1998). Estudos com ratos reportam que o tratamento agudo com nicotina melhora de maneira significativa a memória, e que esta melhora não diminui com o uso crônico deste alcalóide (LEVIN & REZVANI, 2000). O desenvolvimento de modelos animais é importante para a determinação dos mecanismos através dos quais a nicotina induz a melhora do desempenho cognitivo, o que é fundamental para seu possível uso clínico (LEVIN & ROSE, 1991). Rezvani & Levin (2004) mostraram que a nicotina ocasiona um decréscimo na atividade locomotora de animais adolescentes quando comparados a animais adultos. Demonstrando assim, que animais adolescentes possuem uma maior sensibilidade a nicotina, o que pode facilitar ao hábito de fumar.

Sabe-se que a nicotina exerce uma ação inibitória sobre a ingestão de alimentos e conseqüentemente sobre o peso corporal, como mostram trabalhos desenvolvidos em humanos e animais (MIYATA et al., 1999; GUAN et al., 2004). Ela também afeta a taxa metabólica, pois fumantes pesam em média 4 kg a menos que não-fumantes. Esta baixa no peso corporal é mantida pelo aumento da taxa metabólica e também pela supressão do apetite (PERKINS, 1992). O hábito de fumar é um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças coronárias, estando relacionado à hipertensão, a um perfil lipídico desfavorável, além de levar a um prejuízo na ação da insulina (ATTVALL et al., 1993; FACCHINI et al. 1992 *apud* SWISLOCKI et al., 1997). Swislocki et al. (1997) relatam que no teste de tolerância oral a glicose, os animais que receberam nicotina não diferem dos animais controle nos perfis de glicemia, insulina e ácidos graxos livres. Também relatam que a exposição à nicotina leva a uma hipertensão, mas de forma reversível.

No sistema colinérgico, a nicotina age através de receptores colinérgicos nicotínicos, os quais são encontrados no cérebro, gânglios autônomos e na junção neuromuscular. A ativação do receptor nicotínico causa a liberação de neurotransmissores, incluindo acetilcolina, norepinefrina, dopamina, serotonina, beta endorfina, glutamato e outros (ZEVIN, 1998).

Há relatos de que a nicotina possa inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE) (CHANG, 1973, FIGUEIRÓ, 2005, SILVA, 2006). AChE é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, interrompendo a ação deste nas sinapses colinérgicas (TAYLOR, 1996). A AChE é amplamente distribuída no sistema nervoso central e também é encontrada em eritrócitos de mamíferos, linfócitos e plaquetas, onde sua função é incerta (ZAJICEK, 1957; GALERHR & PLATTNER, 1982; SZELENYI et al., 1982 *apud* AL-JAFARI & KAMAL, 1994).

A AChE existe nas formas moleculares: assimétrica (A4, A8 e A12) e globular (G1, G2 e G4). A forma globular está presente no cérebro em diferentes subunidades do monômero (MASSOULIÉ et al., 1993). Estas formas isoméricas diferem quanto à sua localização no neurônio e são solúveis em sal ou detergentes. A fração solúvel em sal consiste basicamente do isômero G1 (monômero) e a fração solúvel em detergente consiste, predominantemente, da forma G4



(tetrâmero). A forma G1 é citosólica e a G4 está ligada à membrana. Em eritrócitos, a forma predominante é a G2, que pode estar solúvel ou ligada à membrana (TAYLOR & BROWN, 1999). O centro ativo da AChE é constituído de dois subsítios principais: um sítio aniônico e um sítio esterásico, contendo os verdadeiros resíduos catalíticos da AChE (TAYLOR & BROWN, 1999). Existe ainda um segundo sítio aniônico, que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (PAS) (NUNES-TAVARES et al., 2002).

Outra enzima que tem recebido atenção como biomarcador de exposição a agentes tóxicos é a porfobilinogênio sintase (PBG-sintase). Esta enzima catalisa a condensação de duas moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA), formando o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG), com perda de duas moléculas de água (CASTELFRANCO et al., 1983). Pertence à rota de biossíntese do grupamento heme e é essencial para todos os organismos vivos. A PBG-sintase por ser uma enzima sulfidrílica, é extremamente sensível a metais pesados como o cádmio, chumbo e mercúrio (ROCHA et al., 1995; PEIXOTO et al., 2003; 2004) assim como a agentes oxidantes (EMANUELLI et al., 1996). Um dos metais, o cádmio está presente no cigarro, isto por estar concentrado nas folhas da planta (KALCHER et al., 1993). Esta enzima também é um marcador de estresse oxidativo porque seu grupo sulfidril ativo é muito sensível a elementos pró-oxidantes (MACIEL et al., 2000). Existem relatos de que esta é inibida pela nicotina *in vitro* e também *in vivo* (DOWLA et al., 1996; PANEMANGALORE et al., 1999; FIGUEIRÓ, 2005; SILVA, 2006).

O uso de drogas por humanos geralmente inicia-se na adolescência, um período no qual o indivíduo apresenta características comportamentais específicas da idade (SPEAR, 2000). Quando o hábito de fumar inicia-se na adolescência há um maior consumo diário, assim como uma menor probabilidade de abandono do vício (CHEN & MILLER, 1998).

Assim, avaliar os efeitos da exposição à nicotina por um período prolongado, sobre a atividade das enzimas: acetilcolinesterase (cerebral e sanguínea) e porfobilinogênio-sintase (hepática e sanguínea) e sobre o comportamento de animais adolescentes torna-se de grande importância.

### 1.1 Objetivos:

- Determinar a influência da exposição à nicotina sobre o ganho de peso corporal e o peso de cérebro e fígado de ratos jovens;
- Investigar o efeito da nicotina sobre a glicemia e o conteúdo de glicogênio hepático;
- Determinar a atividade específica da enzima PBG-sintase de tecido hepático e sangue total de ratos expostos durante 28 e 56 dias à nicotina;
- Determinar a atividade específica da enzima AChE de sangue total de ratos expostos durante 28 dias à nicotina;
- Investigar o desempenho comportamental de ratos expostos ao alcalóide por um período de 21 dias, na tarefa do campo aberto;
- Determinar a atividade específica da enzima AChE de cérebro total, hipocampo e córtex, de ratos expostos à nicotina por 28 dias;
- Determinar a atividade específica da enzima AChE das frações solúveis em sal e detergente de estruturas cerebrais (hipocampo e córtex) de ratos expostos à nicotina por um período de 56 dias;

## 2. REVISÃO DA LITERATURA:

### 2.1 Nicotina:

A nicotina [1-metil-2-(3-piridil) pirrolidina] é um alcalóide de ocorrência natural, encontrado primeiramente em membros da família das solanáceas, como batata, tomate, berinjela e tabaco (DOOLITTLE et al., 1995). Nas folhas do tabaco (Figura 1) age como um inseticida natural. Sua estrutura química ( $C_{10}H_{14}N_2$ ) (Figura 2) é composta de anéis piridina e pirrolidina, sendo uma amina terciária (SCHEVELBEIN, 1982). É um alcalóide líquido, que em contato com o ar, adquire cor escura e o odor característico do cigarro. A nicotina é o principal alcalóide ativo do tabaco e responsável pelo hábito de fumar (SOHN et al., 2003).

A principal fonte de exposição à nicotina é através do tabaco e das terapias de substituição a ele, como os adesivos transdérmicos e as gomas que contêm o alcalóide (HEISHEMAN et al., 1994).

A grande maioria dos fumantes deseja parar de fumar, mas a dificuldade da suspensão do hábito é devido à nicotina ser uma substância que causa dependência química e desta forma apenas uma pequena porcentagem dos fumantes consegue de maneira satisfatória a interrupção do hábito de fumar (USDHHS, 2000).



Fig.1. *Nicotiana tabacum*

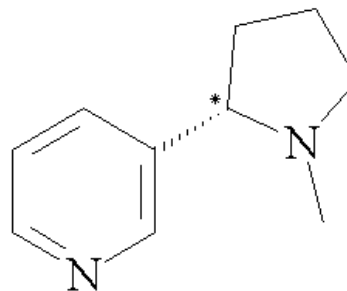


Fig. 2. Estrutura química da nicotina

### 2.1.1 Absorção:

A nicotina é absorvida pela cavidade oral, pele, pulmão, bexiga e trato gastrointestinal (YILDIZ, 2004). Sua absorção através das membranas biológicas é dependente do pH. Ela é uma base fraca com um pKa de 8,0. Em seu estado ionizado, como em meios ácidos, não pode cruzar rapidamente as membranas. Desta forma, sua absorção aumenta quando o pH da solução torna-se mais básico e diminui quando o pH torna-se ácido, em função disto a absorção através do estômago é pobre, mas é bem absorvida no intestino delgado, onde o pH é mais alcalino e possui uma maior área de contato (HUKKANEN et al., 2005).

O pH do tabaco presente no cigarro é em torno de 5,5 e a nicotina neste pH está positivamente carregada, desta forma é pouco absorvida através da mucosa bucal. Quando a fumaça do cigarro alcança as pequenas vias aéreas e os alvéolos pulmonares, a nicotina é rapidamente absorvida. A rápida absorção de nicotina a partir da fumaça do cigarro pelos pulmões, presumivelmente, em função da grande área dos alvéolos e das vias aéreas e sua dissolução nos fluidos com pH 7,4, facilita sua transferência através das membranas. Em média, cerca de 1 mg (0,3-2,0 mg) de nicotina é absorvido sistematicamente durante o ato de fumar, como mostra o uso de <sup>14</sup>C-nicotina (ARMITAGE et al., 1975 *apud* HUKKANEN et al., 2005). A nicotina é bem absorvida através da pele, e esta é a razão para o risco ocupacional de envenenamento com nicotina, o qual ocorre em plantadores de tabaco, os quais são expostos às folhas secas do mesmo (MCBRIDE et al., 1998).

As várias formulações existentes para a terapia de substituição ao uso do tabaco, como gomas de mascar, adesivos transdérmicos, “spray” nasal e tabletes sublinguais, são tamponados em pH alcalino para facilitar a absorção de nicotina através das membranas celulares. Mas todas essas formas de exposição à nicotina possuem uma absorção mais lenta e ocasionam um aumento gradual na concentração sanguínea, quando comparado ao ato de fumar. Este aumento mais lento na concentração plasmática e especialmente cerebral, faz com que haja um menor abuso no uso dessas terapias. Apenas o “spray” nasal produz uma rápida entrega de nicotina, a qual se aproxima àquela vista para o hábito de fumar (GOURLAY & BENOWITZ, 1997).

### 2.1.2 Distribuição tecidual de nicotina:

Na circulação sanguínea, onde o pH é 7,4, a nicotina encontrase-se em torno de 69% ionizada e 31% permanece na forma não ionizada. Sua ligação às proteínas plasmáticas é menor que 5%. Esta droga é distribuída extensivamente aos tecidos, sua maior afinidade é pelo fígado, rim, baço, pulmão e sua menor afinidade é pelo tecido adiposo. Ela também é capaz de atravessar a barreira placentária facilmente, e há evidências de que o acúmulo de nicotina, no soro e fluido amniótico fetal, esteja em maior concentração que no soro materno (HUKKANEN et al., 2005).

A nicotina liga-se as tecidos neurais com grande afinidade, e a ligação aos receptores é mais intensa nos fumantes quando comparada aos não fumantes. Este aumento é em decorrência do maior número de receptores colinérgicos nicotínicos no cérebro de fumantes (PERRY et al., 1999).

O ato de fumar um cigarro faz com que haja uma rápida entrega de nicotina à circulação venosa pulmonar, a partir da qual este alcalóide move-se rapidamente para o ventrículo esquerdo do coração e posteriormente para a circulação arterial sistêmica e cérebro. O tempo decorrido entre uma tragada e a chegada da nicotina ao cérebro é de 10 a 20 segundos (HUKKANEN et al., 2005). A taxa rápida de entrega de nicotina conseqüente da tragada (ou injeção intravenosa, a qual apresenta uma cinética de distribuição semelhante) resulta em níveis altos de nicotina no sistema nervoso central, com pequeno tempo para o desenvolvimento de tolerância. O resultado é uma ação farmacológica mais intensa (PORCHET et al., 1987). O curto tempo decorrido entre o ato de tragar e a chegada da nicotina no tecido cerebral permite ao fumante ajustar a dose para a obtenção da ação farmacológica desejada e posterior facilitação do desenvolvimento do vício (HUKKANEN et al., 2005).

A concentração arterial de nicotina logo após fumar um cigarro pode ser bastante alta, alcançando cerca de 100 ng/mL, mas normalmente varia entre 20 e 60 ng/mL (HUKKANEN et al., 2005 ).

Em contraste, uma entrega mais demorada de nicotina ocorre quando do uso de adesivos transdérmicos, resultando em concentrações muito menores no tecido cerebral e o aumento gradual nos níveis de nicotina no sistema nervoso central

permite o desenvolvimento de uma considerável tolerância aos seus efeitos farmacológicos (HUKKANEN et al., 2005).

### 2.1.3 Metabolismo:

A nicotina é metabolizada pelo fígado a um grande número de metabólitos. Em humanos, cerca de 70 a 80% da nicotina é convertida a cotinina, por C-oxidação, e cerca de 4 a 7% a nicotina-N-óxido, através de N-oxidação (BENOWITZ & JACOB, 1994) (Figura 3-dois principais metabólitos). O mecanismo proposto de conversão da nicotina à cotinina (C-oxidação) envolve a hidroxilação da nicotina por enzimas microsomais e a conversão ao correspondente aldeído e posterior produção de cotinina por uma enzima citosólica (HUCKER et al., 1960 *apud* HUKKANEN et al., 2005). A maioria das enzimas envolvidas neste processo já está identificada. A enzima mais importante na conversão de nicotina à cotinina é a CYP2A6, formalmente conhecida como cumarina 7-hidroxilase (NAKAJIMA et al., 1996, MESSINA et al., 1997). A conversão de nicotina a nicotina-N-óxido (N-oxidação) envolve uma 3-monooxigenase que contém flavina (FMO<sub>3</sub>), resultando na formação de dois diasterisômeros, o cis-1'-(R)-2'-(S) e trans-1'-(R)-2'-(S) isômeros. Em humanos, somente o isômero trans foi detectado na urina (CASHMAN et al., 1992).

A cotinina é muito mais polar que a nicotina, é metabolizada de forma mais lenta e possui pouco, se algum, metabolismo de primeira passagem quando administrada oralmente (ZEVIN et al., 1997).

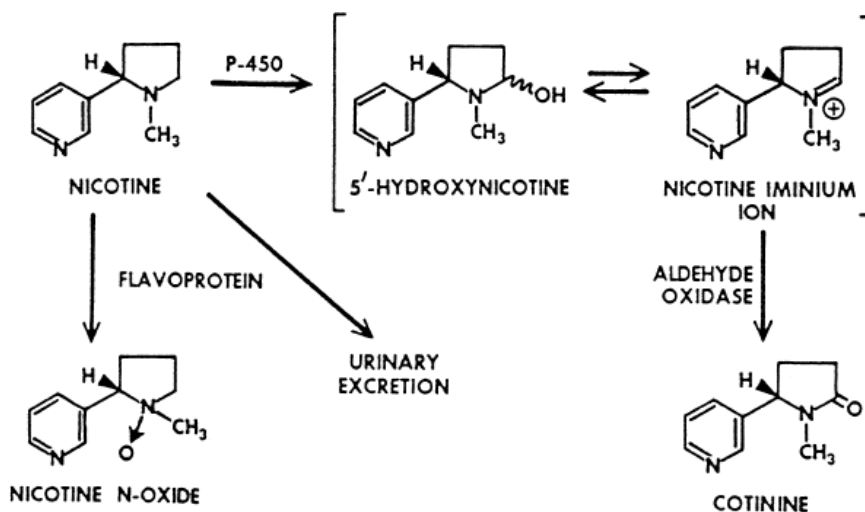


Fig.3. Principais metabólitos da nicotina (Zevin et al., 1998).

#### 2.1.4 Excreção:

Nicotina pode ser excretada pela urina, fezes, bile, saliva, suco gástrico, suor e leite materno (YILDIZ, 2004). A meia-vida de eliminação da nicotina é de 2 a 3 horas. Pela urina, é excretada através de filtração glomerular e secreção tubular, com reabsorção variável dependendo do pH urinário. Na urina ácida a nicotina encontra-se na sua maioria ionizada e desta forma a reabsorção tubular é minimizada. Já na urina alcalina, uma grande fração da nicotina está na forma não-ionizada e assim permitindo reabsorção tubular e desta forma menos nicotina é excretada na urina (HUKKANEN et al., 2005).

A cotinina possui uma meia-vida de eliminação mais longa, de 14 a 20 horas. Uma vez que a cotinina não se liga de maneira apreciável às proteínas plasmáticas, ocorre uma extensiva reabsorção tubular. A excreção de cotinina é menos influenciada pelo pH urinário do que a nicotina, uma vez que essa é menos básica e desta forma está na forma não-ionizada na faixa de pH fisiológico (HUKKANEN et al., 2005).

Embora a nicotina possua uma meia-vida de cerca de 2 horas, esta se acumula no corpo de um fumante regular por um período de 6 a 8 horas e

permanece em níveis significativos durante a noite ou durante um período de várias horas sem fumar (BENOWITZ & JACOB, 1994).

#### 2.1.5 Farmacodinâmica:

A nicotina está amplamente disponível em produtos derivados do tabaco e em certos pesticidas; possui diversas ações farmacológicas e também pode ser fonte de considerável toxicidade. A nicotina age combinando-se aos receptores colinérgicos nicotínicos, os quais são encontrados no cérebro, gânglios autônomos e na junção neuromuscular (ZEVIN et al., 1998).

Quando a nicotina liga-se a seu receptor ocorre uma mudança alostérica nas subunidades deste, resultando em um estado de ativação com a abertura do canal iônico e, posteriormente, um estado de dessensibilização com o fechamento do canal (LENA & CHANGEUX 1993 *apud* ZEVIN et al., 1998).

Os receptores nicotínicos neurais são compostos por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Uma variedade de combinações dessas subunidades já foi identificada e é esta variedade que confere propriedades estruturais e funcionais distintas a diferentes subtipos de receptores nicotínicos (DAJAS-BAILADOR & WONNACOTT, 2004). Estes diferentes receptores nicotínicos são encontrados em diferentes regiões cerebrais, e variam em relação à afinidade de ligação e a resposta à estimulação por seus agonistas. Esta variação na estrutura e na função dos receptores nicotínicos ajuda a explicar a diversidade de efeitos ocasionados pela nicotina (ZEVIN et al, 1998).

A ativação dos receptores nicotínicos ocasiona a liberação de neurotransmissores, como por exemplo: acetilcolina, norepinefrina, dopamina, serotonina, beta-endorfina, glutamato, entre outros (ZEVIN et al., 1998).

Em doses baixas a nicotina causa uma ativação simpática através da ativação de receptores periféricos ou através de um efeito direto no cérebro, com conseqüente aumento nos batimentos cardíacos e pressão sanguínea. Já em doses elevadas, ela age diretamente no sistema nervoso periférico, produzindo estimulação ganglionar e liberação de catecolaminas pelas adrenais. Em doses extremamente altas, causa hipotensão e bradicardia (ZEVIN et al., 1998).



### 2.1.6 Dependência, tolerância e abstinência:

A nicotina causa dependência profunda, demonstrada pela dificuldade dos fumantes em abandonar o hábito. A exposição repetida ou prolongada a nicotina induz tolerância. Assim, depois de repetidas doses, uma determinada dose da droga produz menor efeito do que anteriormente, desta forma é necessário o aumento da dose para que se obtenha o efeito desejado (SILVA, 1998; SOHN et al., 2003).

A tolerância à nicotina manifesta-se pela ausência de náuseas, tontura e outros sintomas característicos, mesmo havendo o consumo de grandes quantidades desta substância (SOHN et al., 2003).

A abstinência à nicotina, após um longo período de uso, produz alguns sintomas característicos como: humor deprimido, insônia, irritabilidade, frustração, ansiedade, dificuldade de concentração, cansaço, diminuição dos batimentos cardíacos, e aumento do apetite com conseqüente ganho de peso. Estes sintomas podem surgir após algumas horas de abstinência e suas manifestações são máximas dentro de 24 a 48 horas e decrescem gradualmente após um período de duas semanas (SILVA, 1998; SOHN et al., 2003).

### 2.1.7 Efeitos fisiológicos e bioquímicos da nicotina:

No sistema nervoso autônomo, a nicotina atinge todos os gânglios autonômicos, simpáticos e parassimpáticos. Além disso, ainda estimula a medula da supra-renal provocando a liberação de epinefrina e norepinefrina, que ativam receptores viscerais e provocam ações reflexas. No sistema respiratório, a nicotina inicialmente exerce estimulação, já em elevadas doses observa-se depressão deste sistema. A nicotina pode paralisar os músculos respiratórios pela sua ação direta sobre as junções neuromusculares. No sistema cardiovascular provoca aumento da frequência cardíaca e elevação da pressão arterial. Também ocasiona redução do apetite. Na pele observa-se queda da temperatura devido à vasoconstrição provocada por mecanismo central. No sistema urinário há diurese pela inibição da vasopressina (SILVA, 1998).

Sabe-se que a nicotina exerce uma ação inibitória sobre a ingestão de alimentos e conseqüentemente sobre o peso corporal, como mostram trabalhos desenvolvidos em humanos e animais (MIYATA et al., 1999; GUAN et al., 2004). Ela também afeta a taxa metabólica, pois fumantes pesam, em média, 4 kg a menos que não-fumantes. Esta baixa no peso corporal é mantida pelo aumento da taxa metabólica e também pela supressão do apetite (PERKINS, 1992).

O uso prolongado de gomas de mascar que contêm este alcalóide está associado com o desenvolvimento de hiperinsulinemia e resistência à insulina. Desta forma a nicotina é tida como o possível agente causador da relação existente entre o hábito de fumar e o desenvolvimento de resistência à insulina (ELIASSON et al., 1996).

A nicotina possui uma série de efeitos endócrinos, incluindo liberação de ACTH e cortisol (ZEVIN et al., 1998).

Estudos relatam que o tratamento agudo com nicotina ocasiona uma supressão da atividade locomotora de ratos. O tratamento crônico tende a estimular a atividade locomotora (BEVINS & BESHEER, 2001). Outro estudo também demonstrou que a exposição aguda à nicotina produz um decréscimo na atividade locomotora dos animais adolescentes quando comparados aos animais adultos (REZVANI et al., 2004).

Pequenas doses de nicotina administradas a ratos adultos, ocasionam um aumento na porcentagem de respostas corretas (precisão), diminuem os erros de omissão e o tempo de reação, assim como aumentam as respostas antecipatórias na tarefa 5-CSRTT (five-choice serial reaction time task). Desta forma Stolerman et al. (2000) concluem que doses apropriadas de nicotina podem produzir melhoras no desempenho de ratos normais em uma tarefa de atenção.

Pauly et al. (2004) demonstraram que ratos machos, expostos a nicotina durante o período intra-uterino apresentam hiperatividade nos dias 40 e 60 após o nascimento na tarefa comportamental do campo aberto. Já as fêmeas não demonstram nenhum sinal de hiperatividade, mas apresentam uma atenuação significativa da resposta hipotérmica. Os autores sugerem assim, que a exposição à nicotina durante a gestação produz mudanças persistentes e dependentes do gênero sobre o comportamento e a sensibilidade a este alcalóide.

A habilidade da nicotina em produzir efeitos únicos na adolescência está no fato de que o desenvolvimento cerebral continua durante este período. Replicação

celular, apoptose, formação sináptica e a formação das respostas comportamentais são consolidadas durante a adolescência (HUNTENLOCHER, 1990 *apud* TRAUTH et al. 2000; SPEAR, 2000).

Quando o hábito de fumar inicia-se nesta fase há um maior consumo diário, assim como uma menor probabilidade de abandono do vício (CHEN & MILLER, 1998).

Estudos em ratos sugerem que a nicotina é neuroteratogênica e que o cérebro adolescente é vulnerável aos efeitos tóxicos deste alcalóide (SLOTKIN, 2002) e que, ratos adolescentes e adultos podem diferir quanto à distribuição, densidade ou afinidade dos receptores nicotínicos a nicotina (TRAUTH et al., 2000).

Entre os efeitos benéficos da nicotina sobre o desempenho cognitivo em humanos, as descobertas mais consistentes têm sido em relação à atenção (STOLERMAN et al., 1995).

Alguns estudos também relatam a possibilidade de seu uso terapêutico na redução dos déficits de desempenho em pacientes com doença de Alzheimer, déficit de atenção, hiperatividade e esquizofrenia (SAHAKIAN et al., 1989; LEVIN et al., 1996).

Hahn & Stolerman (2002) relatam que a nicotina induz a uma melhora da atenção após tratamento crônico e que esta descoberta é de extrema importância para a utilização terapêutica desta droga, uma vez que este efeito pode ser o motivo do uso contínuo do fumo.

## 2.2 Sistema Colinérgico:

A acetilcolina (ACh) (Figura 4) é o neurotransmissor das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos sistemas nervoso central e periférico. É sintetizada no citosol do neurônio a partir da acetil coenzima-A e da colina.

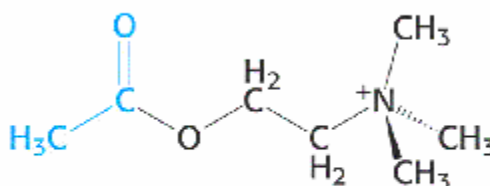


Fig.4. Estrutura química da acetilcolina (adaptado de [http:// www.unizar.es](http://www.unizar.es)).

A acetil coenzima-A tem origem mitocondrial, ao passo que a colina provém da fenda sináptica, extracelular. A colina atravessa a membrana do terminal axônico por um mecanismo de transporte ativo específico (SILVA ,1998). A combinação da acetil-CoA à colina é catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT). Depois de sintetizada, a acetilcolina é armazenada nas vesículas sinápticas. Este neurotransmissor possui um papel crucial no sistema nervoso central. No terminal axonal, as vesículas pré-sinápticas contendo acetilcolina ficam armazenadas até que haja um estímulo que as libere.

O impulso nervoso, ou potencial de ação, ao chegar ao botão sináptico onde estão as vesículas sinápticas, ocasiona uma despolarização da membrana pré-sináptica. Aumentando a condutância do cálcio, o que favorece a entrada deste no axônio. A liberação da acetilcolina varia diretamente com a concentração de cálcio (PRADO et al., 2002). Posteriormente ocorre o “rompimento das vesículas” e o extravasamento do neurotransmissor na fenda sináptica, ocorrendo a fusão com a membrana. A acetilcolina liberada pode difundir-se no espaço extracelular, ser degradada a colina e ácido acético pela acetilcolinesterase ou ainda combinar-se com

receptores colinérgicos pós e pré-sinápticos. Os receptores colinérgicos são classificados em nicotínicos e muscarínicos, os quais transmitem os sinais por mecanismos diferentes. Os receptores muscarínicos e nicotínicos cerebrais atuam a nível pré-sináptico. Porém os receptores nicotínicos estão distribuídos de modo mais esparsos e facilitam a liberação de outros neurotransmissores como a dopamina (RANG et al., 2004). Os receptores nicotínicos são formados por diversas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\alpha 2 - \alpha 10$ ,  $\beta 2 - \beta 4$ ). As diferentes associações destas subunidades conferem propriedades estruturais e funcionais distintas aos diferentes subtipos de receptores nicotínicos (FENSTER et al., 1997 *apud* DAJAS-BAILADOR & WONNACOTT, 2004).

Logo após exercer sua ação a acetilcolina sofre hidrólise pelas colinesterases, liberando ácido acético e colina. Nesta hidrólise, que ocorre na fenda sináptica, cerca de 50% da colina produzida é recaptada pelo terminal axônico, e, posteriormente, é reutilizada para a biossíntese de acetilcolina (SILVA, 1998).

### 2.2.1 Colinesterases

Estas enzimas são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidade aos substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual. As colinesterases desempenham papel importante na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de outras funções, como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos (MASSOULIÉ et al., 1993).

Acetilcolinesterase (AChE; E.C 3.1.1.7) hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, e a butirilcolinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8) hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas as colinesterases são amplamente distribuídas no organismo (TAYLOR & BROWN, 1999).

### 2.2.2. Acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7)

Esta enzima possui um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica. Ela é responsável pela hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina. É uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das

sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular (MASSOULIÉ et al., 1993).

A AChE está amplamente distribuída no sistema nervoso central e também é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (SILVA, 1998).

### 2.2.3 Estrutura da acetilcolinesterase

A AChE existe em duas classes gerais de formas moleculares: como oligômeros homoméricos simples de subunidades catalíticas e como associações heteroméricas de subunidades catalíticas e subunidades estruturais.

Os oligômeros homoméricos simples aparecem como: monômeros, dímeros e tetrameros, dando origem, assim, às formas globulares (G): G1, G2 e G4. As associações heteroméricas de subunidades catalíticas e subunidades estruturais resultam nas formas estruturais assimétricas (A): A4, A8 e A12 (Figura 5) (MASSOULIÉ et al., 1993). As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, provavelmente com o intuito de exportação, ou então se apresentam associadas à membrana externa da célula por meio de uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou de um glicofosfolípídeo acoplado. A AChE que se apresenta nas formas heteroméricas encontra-se associada com a lâmina basal externa na sinapse e é particularmente abundante na junção neuromuscular (TAYLOR & BROWN, 1999). A maior parte da AChE encontrada no tecido nervoso é do tipo globular, predominantemente G4, ligada à membrana (MASSOULIÉ et al., 1993). Os eritrócitos, linfócitos e plaquetas contêm a forma globular dimérica G2, tetramérica G4 e a assimétrica A12, respectivamente.

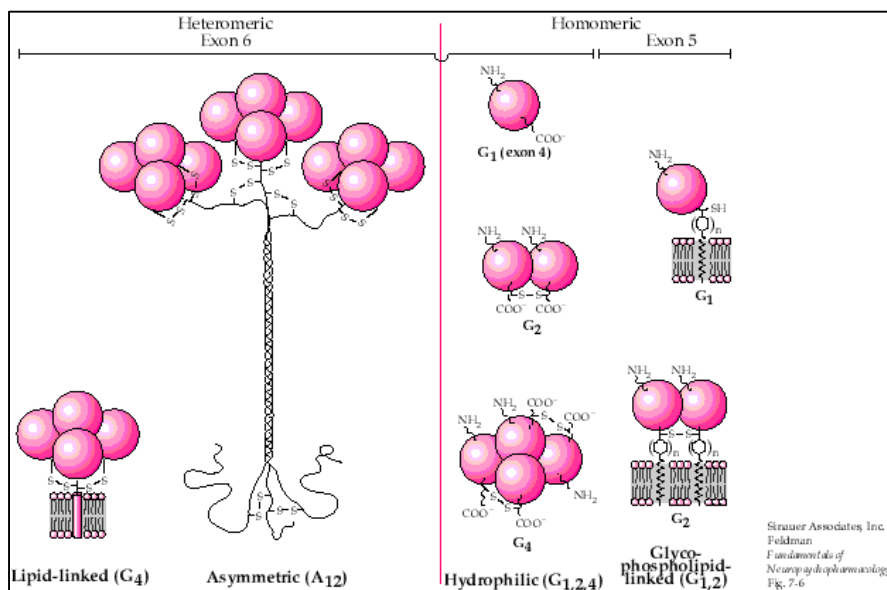


Fig.5. Isoformas da AChE ([http://www.chemistry.emory.edu/ach\\_inactivation.htm](http://www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm))

#### 2.2.4 Mecanismo de ação

A estrutura tridimensional da AChE demonstra que seu centro ativo é formado por resíduos da chamada tríade catalítica: serina 203, histidina 447 e glutamato 334.

A visão tradicional do sítio ativo da AChE foi considerada como tendo dois subsítios: um sítio carregado negativamente ou aniônico, ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga, e um sítio esterásico contendo os verdadeiros resíduos catalíticos, o qual aloja o grupamento éster e carbonila da ACh (Figura 6) (TAYLOR & BROWN, 1999). Um segundo sítio aniônico que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (peripheral anionic site-PAS), foi proposto com base na ligação de compostos bis quaternários. Tem sido proposto que este sítio possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima ou ainda na inibição por excesso de substrato (NUNES-TAVARES et al., 2002).

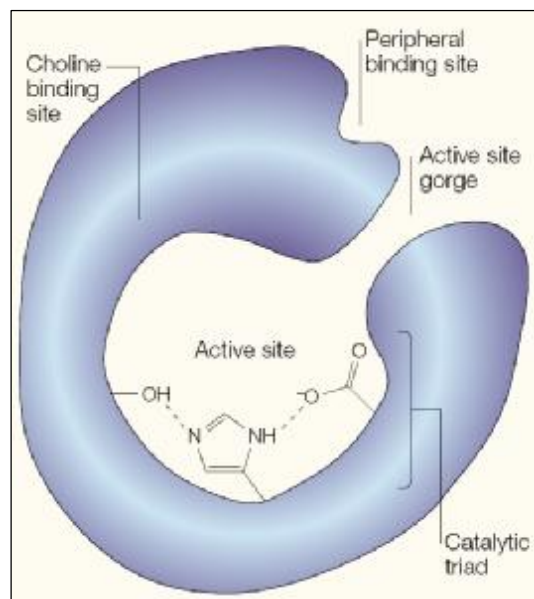


Fig. 6. Sítio catalítico da AChE (adaptado de Soreq & Seidman, 2001).

A enzima é classificada como uma serina hidrolase. Seu mecanismo catalítico assemelha-se ao de outras hidrolases, onde o grupamento hidroxila da serina torna-se altamente nucleofílico por um sistema de reposição de cargas que envolvem o grupamento carboxila do glutamato, o imidazol da histidina e a hidroxila da serina (TAYLOR, 1996). Quando do ataque enzimático sobre o éster, é formado um intermediário tetraédrico entre a enzima e o éster que se rompe e forma um conjugado acil-enzima, com a liberação concomitante da colina. A acetil enzima é passível de hidrólise e esta resulta na liberação de acetato e na regeneração da enzima ativa (FROEDE & WILSON *apud* TAYLOR, 1996).



### 2.3 Porfobilinogênio-Sintase (E.C. 4.2.1.24)

A enzima citosólica porfobilinogênio-sintase (PBG-sintase), também conhecida como delta-aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), foi descrita pela primeira vez em 1955 por Gibson et al. Ela é uma metaloenzima, uma vez que requer zinco para seu funcionamento.

A PBG-sintase catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido- $\delta$ -aminolevulínico, formando o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (Figura 7), com a perda de duas moléculas de água e envolve a formação de uma base de Schiff entre uma molécula de substrato com um grupo amino da enzima (JAFFE et al., 1995). A reação catalisada pela PBG-sintase faz parte da rota de biossíntese de compostos tetrapirrólicos, principalmente o heme, clorofilas, corrinas e bilinas (CASTELFRANCO et al., 1983). Estes desempenham papéis metabólicos importantes, principalmente como grupo prostético de proteínas.

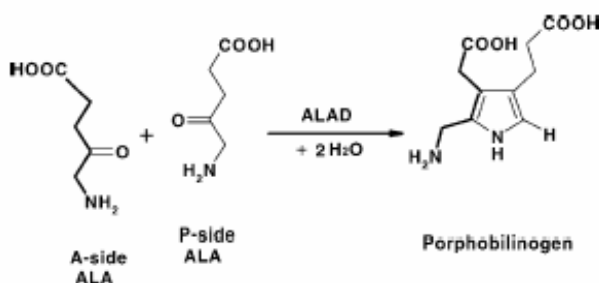


Fig.7. Síntese de porfobilinogênio (adaptado de Lee et al., 2003).

O sítio ativo da enzima envolve 2 resíduos de cisteína, 2 resíduos de histidina e 1 átomo de zinco. O grupamento SH é essencial para o funcionamento da enzima e o zinco possui a função de manter este grupamento na forma reduzida (BLOCK et al., 1990).

O heme (protoporfirina) é encontrado como grupo prostético da hemoglobina e da mioglobina (participam do transporte e armazenamento de oxigênio); dos

citocromos a, b, c (participando no transporte de elétrons) e P450 (que catalisam reações de oxidação de xenobióticos); e das catalases, peroxidases e triptofânio pirrolase do sistema de proteção contra peróxidos (MAINES, 1984).

A biossíntese do heme ocorre parcialmente na mitocôndria e no citosol. O  $\delta$ -ALA é sintetizado mitocondrialmente e transportado para o citosol para sua conversão em porfobilinogênio (Figura 8). Se ocorrer alguma inibição na via de síntese do heme, ocorre o acúmulo de porfirinas circulantes, que irão gerar espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar alterações nas estruturas protéicas e inativação da enzima PBG-sintase, o que acarreta um prejuízo nas concentrações de heme (AFONSO et al., 1997).

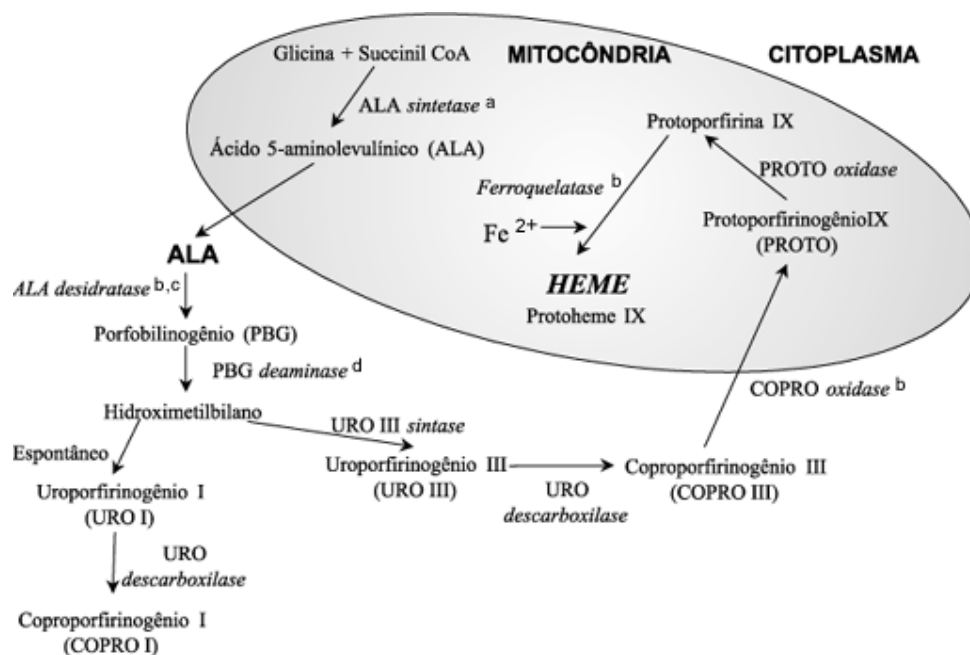


Fig.8. Via biossintética do grupo heme ([http:// www.scielo.br](http://www.scielo.br)).

A PBG-sintase por ser uma enzima sulfidrílica, é extremamente sensível a metais pesados como o cádmio, chumbo e mercúrio (ROCHA et al., 1995; PEIXOTO et al., 2003; 2004) assim como a agentes oxidantes (EMANUELLI et al., 1996).

Experimentos com ratos jovens mostram que a administração de cloreto de mercúrio (ROCHA et al., 1995; PEIXOTO et al., 2003), metilmercúrio (ROCHA et al., 1993) ou acetato de chumbo (ROCHA et al., 1995) inibe a atividade da PBG-sintase de diversos tecidos e a administração de cloreto de cádmio (PEIXOTO et al., 2003) inibe a atividade da enzima hepática. Assim a sensibilidade da PBG-sintase a metais torna esta enzima um importante biomarcador para a exposição ou intoxicação por metais pesados.

Dowla et al. (1996) relata a inibição *in vitro* e Panemangalore et al. (1999) a inibição *in vivo* da enzima PBG-sintase eritrocitária humana pela nicotina.

A inibição da enzima por cádmio e nicotina torna-se ainda mais interessante uma vez que ambos são constituintes do cigarro. O cádmio está presente no cigarro, por estar concentrado nas folhas da planta (KALCHER et al., 1993) e a nicotina é um constituído natural das folhas do tabaco.

### 3. RESULTADOS:

#### 3.1 Manuscrito I:

Sensitivity of young rats to nicotine exposure: physiologic and biochemical parameters

A.S. José<sup>a</sup>, C. Franciscato<sup>a</sup>, F. Sônego<sup>b</sup>, M. Figueiró<sup>a</sup>, M.E. Pereira<sup>\*a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica; <sup>b</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97015-900 Santa Maria, RS, Brazil

\* Corresponding author. Fax + 55 55 3220 8799. *E-mail address:*

[pereirame@yahoo.com.br](mailto:pereirame@yahoo.com.br) (M.E. Pereira).

**Abstract:**

This work investigated the effects of prolonged exposure of young rats to nicotine on some physiological and biochemical parameters. Wistar male rats (30 days old) were treated (s.c.) with saline 0.9% or nicotine 5 mg/kg/day for 28 or 56 days. The animals received 5 injections per day (8, 10, 12, 14, 16:00) on the dark period of the cycle. They were sacrificed 90 min after the last dose and samples were collected. In relation to weights of body and organs, the body and liver weights were decreased by nicotine exposure for 56 days. Treatment with nicotine for 28 or 56 days decreases the hepatic glycogen but not blood glucose levels. The activities of blood and hepatic PBG-synthase and blood acetylcholinesterase were not affected for these treatments. These results show that although the younger animals are, in general, more sensitive to nicotine effects, the most of parameters here analyzed were not affected by prolonged nicotine exposure, with exception to storage of glucose, body and liver weight.

*Keywords:* Nicotine, PBG-synthase, glucose, glycogen, AChE, weight gain, young rats.

## Ethics

The experiments of this work involved the utilization of experimental rats. However, aiming for the protection and welfare of animals, the studies were conducted in accordance with the national and institutional guidelines (University Ethics Committee Guidelines-Process No. 23081.017288/2006-06) for experiments with animals.

## 1. INTRODUCTION:

Nicotine is a naturally occurring alkaloid found primarily in the members of the solanoceous plant family such as potato, tomato, green pepper, and tobacco (Doolittle et al., 1995). The principal source of nicotine exposure is through the use of tobacco and nicotine replacement therapies such as transdermal nicotine patches and nicotine gum (Heisheman et al., 1994). Dermal exposure to nicotine during tobacco production may be responsible for some of the health conditions found in tobacco farm works, since this alkaloid is reported to exert numerous toxic effects on the central and peripheral nervous systems (Nakayama et al., 1993). Farm workers are known to develop "Green Tobacco Sickness" after working with wet tobacco, and it has been attributed to dermal nicotine absorption (Anonymous, 1993).

A large range of toxic effects of nicotine was found as in human as in experimental animals (Zevin et al., 1998; Boyce et al., 2000, Yildiz, 2004), and several target has been susceptible to it (Zevin et al., 1998). Physiologic effects have been described in chronic cigarette smokers. Nicotine exerts important inhibitory actions on eating and body weight in human and animals (Miyata et al., 1999; Guan et al., 2004). Alterations on body weight (Carney and Goldberg, 1984) and resistance to obesity can be consequence of reduced food intake and increase in the amount of energy consumption due to metabolic changes (Liu et al., 2003) such glucose metabolism (Jensen et al., 1995)

Long-term use of nicotine gum has been associated with hyperinsulinemia and insulin resistance, implicating nicotine as a possible causative agent (Eliasson et al., 1996). The insensitivity to insulin and relative insulin deficiency lead to a decrease in glucose utilization by liver, muscle and adipose tissue and to an increase in hepatic

glucose production (MacGarry, 1992). Unlikely, a study involving healthy and normal weight males reported that intravenous administration of low doses of nicotine did not alter insulin or glucose levels (Anderson and Arner 1993 *apud* Morgan et al., 2004).

An enzymatic process that has received attention is the synthesis of porphobilinogen (PBG) since it is precursor of the large variety of heme compounds such hemoglobin, myoglobin and cytochrome. Its synthesis can be decrease due to sensitivity of PBG-synthase, an important enzyme of this rout, to nicotine as *in vitro* as *in vivo* (Dowla et al., 1996; Panemangalore et al., 1999). It is a zinc-dependent sulphhydryl-containing enzyme, that catalyses the condensation of two  $\delta$ -aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA) molecules to form PBG (Gibson et al., 1955).

Working with humans unexposed to agricultural chemicals, Dowla et al. (1996) found *in vitro* inhibition of erythrocyte PBG-synthase by nicotine. Panemangalore et al. (1999) reported *in vivo* inhibition PBG-synthase from erythrocytes of workers occupationally exposed to agricultural chemicals during the production of tobacco.

Other enzyme which has received attention is the acetylcholinesterase (AChE). Chang et al. (1973) showed the inhibition of rat brain AChE by nicotine. These animals were treated with 1 mg/kg/day for a period of 8 or 16 weeks. They suggested that the administration of nicotine induced a sustained effect on the AChE activity. Panemangalore et al. (1999) reported the inhibition of human plasma cholinesterase of workers exposed to nicotine.

AChE is an enzyme widely distributed in the central nervous system and in blood (Al-Jafari & Kamal, 1994; Massoulié et al., 1993). It plays a crucial role because hydrolyzes the neurotransmitter acetylcholine (ACh) and its activity is essential for normal cholinergic transmission and neuromuscular function (Al-Jafari



& Kamal, 1994). The cerebral and blood enzymes present similar structural features, e.g., globular form. Most of the AChE founded in brain tissue is the G4 and the isomer founded in erythrocytes is the G2 globular form (Massoulié et al., 1993). These features make this enzyme an important biomarker to nicotine, since cerebral sources is sensitive to this alkaloid (Chang et al., 1973).

Nicotine has a wide variety of pharmacological and toxicological effects, and its reinforcing effects underlie tobacco use addiction (Benowitz et al., 1996). The drug abuse for humans often begins during adolescence, a period of ontogeny in which individuals exhibit age-specific behavioral characteristics (Spear, 2000). Smoking in adolescence engenders greater addiction, higher daily consumption of cigarettes and reduced probability of quitting (Chen and Millar, 1998).

The objective of present work was to investigate the sensitivity of young rats to prolonged exposure to nicotine, in doses equivalent to those used by cigarette smokers (Slotkin, 1997; Xu et al., 2001) and gum nicotine users (Benowitz et al., 1988), on physiologic and biochemical parameters. As parameters were studied the body, brain and hepatic weights, the glycemia and hepatic glycogen, the activities of the blood and hepatic PBG-synthase and also blood AChE, two enzymes widely used as biomarkers of several toxicants agents.

## 2. MATERIAL AND METHODS:

### 2.1 Chemicals:

Acetylthiocholine (ATC), ethopropazine, Tris (hydroxymethyl-d<sub>3</sub>) amino-d<sub>2</sub>-methane, 5, 5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB),  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA), bovine albumin and Coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Potassium and sodium phosphate were obtained from Reagen. Glacial acetic acid, ortho-phosphoric acid, absolute ethanol and ether were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The kit for dosage of glucose was purchased from Labtest (Lagoa Santa/MG/Brazil). Nicotine 98% was obtained from Aldrich (Germany). Glycogen and Triton X-100 were purchased from Merck (Darmstadt/Germany). All the others were of analytical grade.

### 2.2 Animals:

Young male Wistar rats (30 days old) (n=36) obtained from the General Animal House of the UFSM were transferred to our colony room and maintained in groups of 6 in opaque plastic cages, at room temperature for 28 or 56 days. The animals were maintained on an inverted 14-h light/ 10-h dark cycle. They had free access to food and water.

### 2.3 Treatment:

The treatment consisted of subcutaneous (s.c.) injections of saline 0.9% or nicotine 5 mg/kg/day, pH 8.0, divided in 5 injections (8, 10, 12, 14, 16:00). The administration of solutions was done in the dark period of the cycle, lighted with a red lamp of 40 W. The animals were weighted once a week.

#### 2.4 Tissue preparation:

After 28 or 56 days of treatment, the animals were anesthetized with ether and killed by decapitation about 90 min after the last dose of nicotine or saline. Liver was removed and weighted and blood was collected in heparinized tubes.

Glucose was determined in plasma. Blood was centrifuged at 1,000 g for 15 min at 4°C; the supernatant was removed and frozen at -20°C until analysis.

Glycogen was assayed on liver tissue. An aliquot of each liver was removed, weighted and stored at -20°C until glycogen extraction and quantitative analysis.

The PBG-synthase activity was determined in liver and blood. Liver was homogenized in saline 0.9% 1:7 (w/v), and centrifuged at 8,000 g for 40 min at 4°C. The supernatant obtained was used in the enzyme assay. Blood was hemolyzed in distilled water 1:4 (v/v), with agitation by 10 min in ice bath. The hemolyzed was used to enzymatic assay.

AChE activity was determined in blood which was hemolyzed in 0.1 mmol/L potassium/sodium phosphate buffer containing 0.03% Triton X-100 1:100 (v/v). The biological materials were frozen at -20°C until assay.

#### 2.5 Glucose and glycogen determination:

The determination of glucose was done by measuring the product formed in a reaction medium containing phosphate buffer 9.9 mmol/L, pH 7.4, phenol 9.9 mmol/L, glucose oxidase  $\geq 12,000$ U/L, peroxidase  $\geq 1,000$  U/L and 4-amino-antipirine 0.4 mmol/L. The incubation was started by adding 10  $\mu$ L of sample and realized at 37°C for 10 min. The absorbance was measured at 500 nm and the sample glucose concentration was compared to the glucose standard curve.

For the extraction of glycogen, to 0.2 g of liver was added 2.0 mL of KOH 30% and heated at 100°C until full dissolution of tissue and, then cooled in cool water. Ethanol (2.0 mL) was added and the mixture was heated at 70°C for 10 min. Next, the tubes were cooled in ice for 3 min and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. Supernatant was discarded and 0.2 mL of HCl 5N and 3.8 mL of distilled water were added to the pellet. The glycogen content was determined by the Krisman method (1962). The sample (50 µL) was mixed with reactive iodine [ $I_2$  0.01% and KI 0.1% in a saturated solution of  $(NH_4)_2SO_4$ ] and the absorbance was determined at 460 nm and compared with a glycogen standard.

#### 2.6 Enzyme assays:

PBG-synthase activity was assayed according to the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product (porphobilinogen) formation, at 39° C with incubation of 120 min for blood and 40 min for liver, except that 76 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 6.8 (liver) and 6.4 (blood), and 2.2 mmol/L ALA were used. The reaction product was determined using a modified Ehrlich`s reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of  $6.2 \times 10^4$  for Ehrlich-porphobilinogen salt. The activity is presented as nmol PBG formed/h/mg of protein.

The blood AChE activity was determined following Ellman`s method modified for Worek et al. (1999). The system was compound of sodium phosphate buffer 0.063 mmol/L pH 7.4, DTNB 0.316 mmol/L, ethopropazine 0.019 mmol/L and the enzymatic material. After 3 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was started with acetylthiocoline 0.45 mmol/L. The increase of absorbance was registered during 2 min at 436 nm. The specific activity is express as µmol ATC hydrolysed/min/mg of protein.

Protein concentration was determined by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) utilizing bovine serum albumin as a standard. All samples were run in triplicate.

### 2.7 Statistical analyses:

The results were analyzed by Student *t*-test. Effects were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

### 3. RESULTS:

The effects of nicotine on body, cerebral and liver weights are shown in Table 1. Student *t*-test revealed that nicotine in both intervals of exposure did not alter the brain weight. The body and liver weights were significantly decreased when the rats were exposed for 56 [body:  $t(9) = 2.244$ ,  $p = 0.05$ ; liver  $t(9) = 2.301$ ,  $p < 0.05$  ], but not for 28 days.

The blood glucose and hepatic glycogen are shown in figure 1. The nicotine did not alter the glycemia of rats exposed at both intervals of treatment. However, hepatic glycogen levels showed significantly lower in rats exposed to nicotine than to saline [Student *t*- test: 28 days,  $t(9) = 2.445$ ,  $p < 0.04$ ; 56 days,  $t(9) = 2.681$ ,  $p < 0.03$ ].

Figure 2 shows the activities of blood and hepatic PBG-synthase. These results demonstrated that rats treated for 28 or 56 days with nicotine presented similar PBG-synthase activities to those treated with saline 0.9 %.

Figure 3 shows the activities of blood AChE from animals submitted to the same treatments. No significantly changes in AChE activities were observed as at 28 as 56 days of exposure to nicotine.

Table 1

Body, total brain and liver weights of rats exposed to saline 0.9% or nicotine (5 mg/kg/day) for a period of 28 or 56 days.

<b>Weight (g)</b>						
	<b>Body</b>		<b>Total Brain</b>		<b>Liver</b>	
	<b>Days of exposure</b>					
<b>Treatment</b>	28	56	28	56	28	56
<b>saline</b>	256.1±11.9 (6)	324.1±20.8 (5)	1.71±0.06 (5)	1.53±0.03 (5)	11.6±0.8 (6)	13.3 ±1.2 (5)
<b>nicotine</b>	248.2±8.8 (6)	278.5±6.9* (6)	1.66±0.01 (5)	1.46±0.05 (5)	10.3±0.5 (6)	10.7±0.3* (6)

The results are presented as mean ± SEM. Significantly different from saline group:

\*  $p \leq 0.05$  (n= number of animals per group)

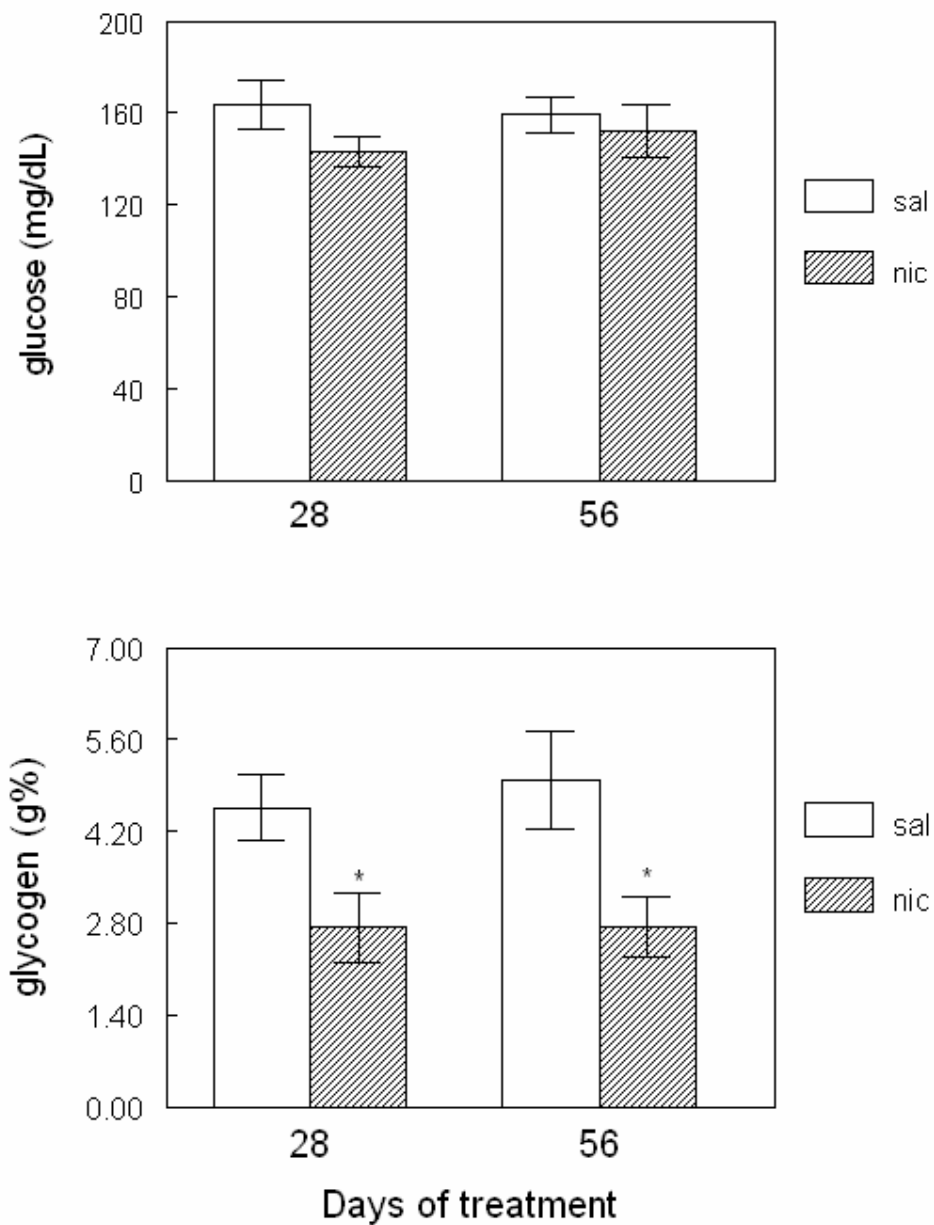


Fig. 1. Plasma glucose and hepatic glycogen levels of rats (n= 5-6) treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) for a period of 28 or 56 days. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \*Significantly different from saline group in the same interval of exposure at least  $p < 0.05$ .



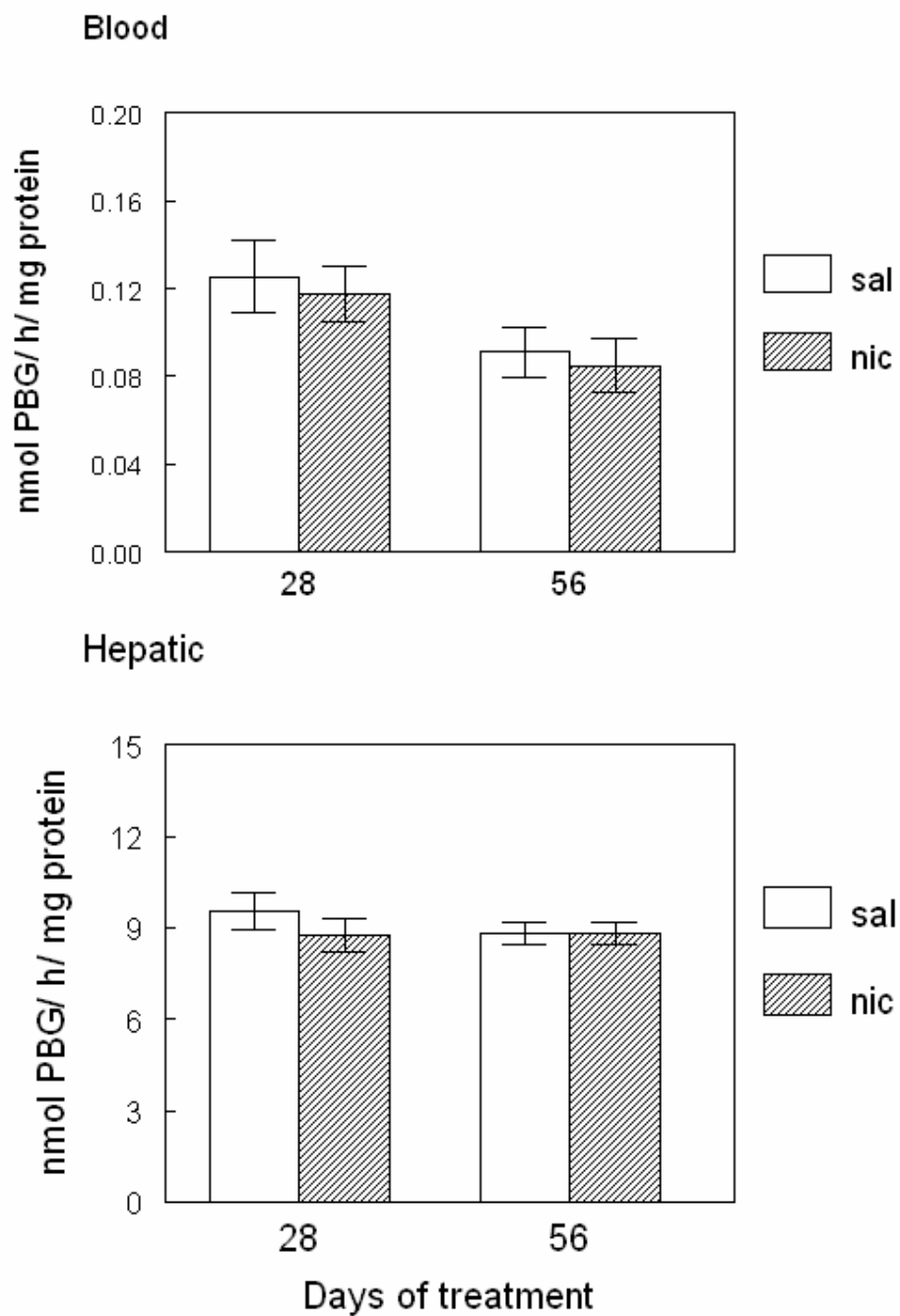


Fig. 2. Blood and hepatic PBG-synthase activities of rats ( $n=6-9$ ) treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) for a period of 28 or 56 days. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M.

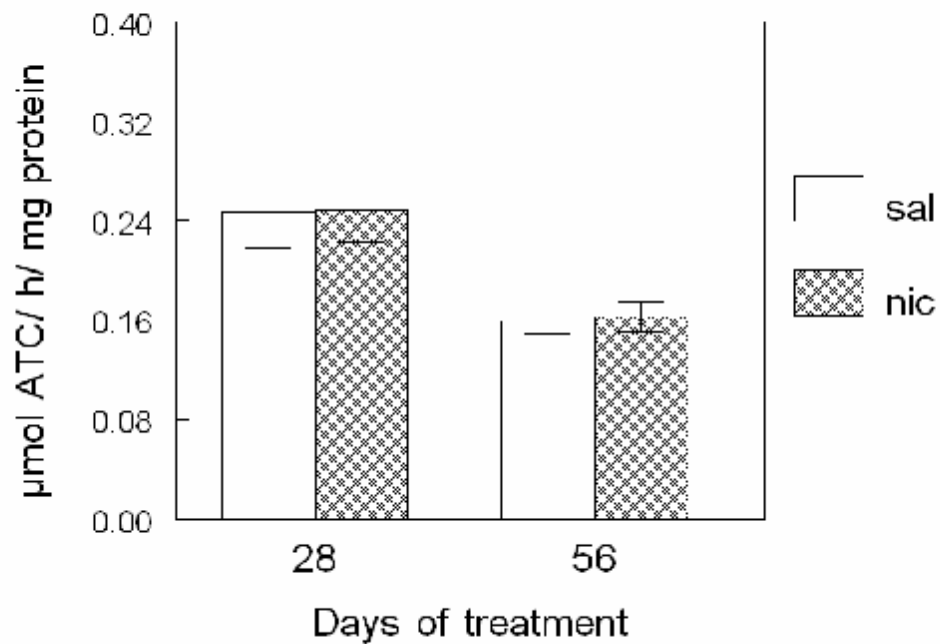


Fig. 3. Blood AChE activities of rats (n= 5-9) treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) for a period of 28 or 56 days. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M.

#### 4. DISCUSSION AND CONCLUSION:

The main objective of this work was to investigate the sensitivity of animals in a precocious age to prolonged exposure to nicotine in doses that would produce corporal nicotine levels similar to that obtained in chronic cigarette smokers (Slotkin et al., 1997; Xu et al., 2001).

The results demonstrate that from all parameter analyzed the body and liver weights and hepatic glycogen were decrease by nicotine exposure. The decrease on body and liver weights was verified only when rats were exposed to nicotine for 56 days (14 and 19.7 %), whereas the decrease on hepatic glycogen was verified as at 28 days (39.9 %) as at 56 days (45 %) of exposure.

Romero et al. (2004) and Newman et al. (1999) reported that nicotine did not change body weight in rat offspring. Nevertheless, nicotine exposure has reportedly resulted in either weight loss or reduced weight gain; both from the thermogenic effect of tobacco smoke, as well as alteration in metabolic rate (Benowitz, 1988; Saah et al., 1994; Perkins et al., 1989 *apud* Swislocki, 2003).

In this study, the plasma glucose levels were not altered. There are reports that show that smoking and subcutaneous injection of nicotine do not alter glucose tolerance or insulin action in type 2 diabetic patients (Epifano et al., 1992) and in adult male Sprague-Dawley rats *in vivo* (Swislocki et al., 1997). However, Saah et al. (1994) reported that nicotine tends to decrease insulin secretion. These discrepancies may be explained by various factors, including the nutritional status, species difference, autonomic neural state, and the amount and route of administration of nicotine (Benowitz and Henningfield, 1994).

Liu et al. (2003) reported that the decrease of the liver weight caused by the administration of nicotine occurred concomitantly with reduction of liver glycogen content, whereas phosphorylase-a activity was significantly increased, glycogen synthetase activity was significantly decreased by nicotine treatment.

The toxic effects of nicotine are well known and dermal exposure to nicotine may be the cause of green tobacco sickness and other health conditions found in tobacco field workers (Ballard, 1995). The absence of effect of nicotine on PBG-synthase was not expected since Dowla *et al.* (1996) found *in vitro* inhibition of erythrocyte PBG-synthase by nicotine over a wide range of concentrations and Panemangalore *et al.* (1999) reported the *in vivo* inhibition of this enzyme. Hodgson and Levi (1996) suggest that this inhibition could be due to the noncompetitive binding of nicotine to the enzyme, since this chemical is neither substrate nor competitor of substrates. This inhibition was not observed in this study, perhaps because nicotine blood concentration was lower than that present on workers' blood, since all of them were heavy smokers and had a constant liaison with the tobacco leaves, and was not enough to inhibit this enzyme.

Dowla et al. (1996) reported the *in vitro* absence of inhibition of plasma cholinesterase activities, whereas Panemangalore et al. (1999) showed *in vivo* inhibition of this enzyme. In the present study, no significant effects of nicotine on blood AChE activities were obtained after 28 or 56 days of treatment. The cholinesterase inhibition and consequently the accumulation of acetylcholine in the central nervous system and other tissues can induce neurological damage (Rao et al., 1992).

The exposure to nicotine 5 mg/kg/day for 28 or 56 days did not inhibit the hepatic and blood PBG-synthase activity either the blood AChE activities. These

results differ of those obtained *in vitro* experiment, where the nicotine inhibited both enzymatic activities (data not shown). The absence of the effect *ex vivo* may be related at least to two possibilities: low levels of nicotine reached *in vivo*; or a possible inhibition induced by low concentrations of the alkaloid (*in vivo*) to be reverted by saturating concentration of substrate assayed *ex vivo*.

Acknowledgements: A.S.J. and C.F. are recipients of fellowships from CAPES; F.S. and M.F. were fellowships from FAPERGS and CAPES, respectively.

## REFERENCES:

- Al-Jafari, A.A. and Kamal, M. A., 1994. The preparation and kinetic properties of multiple forms of chicken brain acetylcholinesterase. *Cell Biochem. Function.* 12, 29-35.
- Andersson, K.E.P., Arner, P., 1993. Changes in circulating lipid and carbohydrate metabolites following systemic nicotine treatment in healthy men. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 17, 675-680.
- Anonymous, 1993. Green tobacco sickness in tobacco harvesters. *J. Am. Med. Assoc.* 69, 2722-2723.
- Ballard, T., Ehlers, J., Freund, E., Auslander M., Brandt, V., Halperin, W., 1995. Green tobacco sickness: occupational nicotine poisoning in tobacco workers. *Arch. Environ. Health.* 50, 384-389.
- Benowitz, N.L., 1988. Pharmacological aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N. Engl. J. Med.* 319, 1318-1330.
- Benowitz, N.L., Henningfield, J.E., 1994. Establishing a nicotine threshold for addiction. The implications for tobacco regulation. *N. Engl. J. Med.* 331, 123-125.
- Benowitz, N.L., 1996. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 597-613.
- Boyce, S., webb, J.K., Shephard, S.C., Russell, M.G.N., Hill, R.G., Pupniak, N.M.J., 2000. Analgesic and toxic effects of ABT-594 resemble epibatidine and nicotine in rats. *Pain.* 85, 443-450.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carney, R.M., Goldberg, A.P., 1984. Weight gain after cessation of cigarette smoking. A possible role for adipose tissue lipoprotein lipase. *N. Engl. J. Med.* 310, 614-616.
- Chang, P.L., Bhagat, B. and Taylor, J.J., 1973. Effect of chronic administration of nicotine on acetylcholinesterase activity in the hypothalamus and medulla oblongata of the rat brain. An ultrastructural study. *Brain Res.* 54, 75-84.

- Chen, J., Millar, W.J. 1998. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep.* 9, 39-46.
- Doolittle, D.J., Winegar, R., Lee, J.K., Caldwell, W.S., Wallace, A., Hayest, J. & Bethlzy, J.D., 1995. The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat. Res.* 344, 95-102.
- Dowla, H.A., Panemangalore, M., Byers, M.E., 1996. Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma in vitro by agricultural chemicals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 107-114.
- Eliasson, B., Taskinen, M.R., Smith, U., 1996. Long term use of nicotine gum is associated with hyperinsulinemia and insulin resistance. *Circulation.* 94, 878-881.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andress Jr., V. & Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Epifano, L., Di Vincenzo, A., Fanelli, C., Porcellati, F., Perriello, G., De Feo, P., Motolese, M., Brunetti, P., Bolli, G.B., 1992. Effect of cigarette smoking and of a transdermal nicotine delivery system on glucoregulation in type 2 diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43, 257-263.
- Gibson, K.D., Neuberger, A., Scott, J.J., 1955. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* 61, 618-629.
- Guan, G., Kramer, S.F., Bellinger, L.L., Wellman, P.J., Kramer, P.R., 2004. Intermittent nicotine administration modulates food intake in rats by acting on nicotine receptors localized to the brainstem. *Life Sci.* 74(22), 2725-2737.
- Heisheman, S.C., Taylor, R.C. Hennigfield, J.E., 1994. Nicotine and smoking: a review of effects on human performance. *Exp. Clin. Pharmacol.* 2, 345-395.
- Hodgson, E., Levi, P.E., 1996. Pesticides: an important but under used model for environmental health sciences. *Environ. Health. Perspect.* 104, 97-106.
- Jensen, E.X., Fusch, C., Jaeger, P., Peheim, E., Horber, F.F., 1995. Impact of chronic cigarette smoking on body composition and fuel metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2181-2185.
- Krisman, C.R. 1962. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal. Biochem.* 4, 17-23.

- Liu, R.-H, Mizuta, M., Matsukura, S., 2003. Long-term oral nicotine administration reduces insulin resistance in obese rats. *Eur. J. Pharmacol.* 458, 227-234.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progr. Neurobiol.* 41, 31-91.
- Maiyata, G., Meguid, M.M., Festssov, S.O., Torelli, G., Kim, H.-J., 1999. Nicotine's effect on hypothalamic neurotransmitters and appetite regulation. *Surgery.* 126, 255-263.
- McGarry, J.D., 1992. What is Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science.* 258, 766-770.
- Nakayama, H., Okuda, H., Nakashima, T., Imaoka, S., Funae, Y., 1993. Nicotine metabolism by rat hepatic cytochrome P450s. *Biochem. Pharmacol.* 45, 2554-2556.
- Newman, M.B., Shytle, R.D., Sanberg, P.R. 1999. Locomotor behavioral effects of prenatal and postnatal nicotine exposure in rat offspring. *Behav. Pharmacol.* 10(6-7), 699-706.
- Panemangalore, M., Dowla, H.A., Byers, M.E., 1999. Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 72, 84-88.
- Perkins, K.A., Epstein, L.H., Stiller, R.L. et al., 1989. Acute effects of smoking and nicotine on resting metabolic rate in cigarette smokers. *Am. J. Clin. Nutr.* 50, 545-550.
- Rao, J.V., Swamy, A.N., Yamin, S., 1992. Rat brain acetylcholinesterase response to monocrotophos and abate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 850-856.
- Romero, R.D., Chen, W-J. A. 2004. Gender-related response in open-field activity following developmental nicotine exposure in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 675-681
- Saah, M.I., Raygada, M., Grunberg, N.E., 1994. Effects of nicotine on body weight and plasma insulin in female and male rats. *Life Sci.* 55, 925-931.
- Sassa, S., 1982. Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase assay. *Enzyme.* 28, 133-145.



- Slotkin, T.A., McCook, E.C, Seidler, F.J., 1997. Cryptic brain cell injury caused by fetal nicotine exposure is associated with persistent elevation of c-fos protooncogene expression. *Brain Res.* 750, 180-188.
- Spear, L.P. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417-463.
- Swislocki, A.L.M., Tsuzuki, A., Tait, M., Khuu, D., Fann, K., 1997. Smokeless nicotine administration is associated with hypertension but not with a deterioration in glucose tolerance in rats. *Metabolism.* 46, 1008-1012.
- Swislocki, A.L.M., 2003. Smokeless nicotine administration does not result in hypertension or deterioration in glucose tolerance or insulin sensitivity in juvenile rats. *Metabolism.* 52, 67-72.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C. & Eyer, P. 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chem. Acta* .288, 73-90.
- Yildiz, D., 2004. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol.* 43, 619-632.
- Xu, Z., Seidler, F.J., Slikker Jr W., Slotkin, T.A., 2001. Fetal and adolescent nicotine administration: effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res.* 914, 166-178.
- Zevin, S., Gourlay, S.G., Benowitz, N.L., 1998. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin. Dermatol.* 16, 557-564.

### 3.2 Manuscrito II:

Long-term nicotine exposure modifies the behavior of rats in the open field but does not alter cerebral acetylcholinesterase

Aline S.Jósê <sup>a</sup>, Fabiane Sônego <sup>b</sup>, Carina Franciscato <sup>a</sup>, Micheli Figueiró <sup>a</sup>, Maria E. Pereira <sup>a, b\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica; <sup>b</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas;  
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

**Abstract:**

The aim of this study was to investigate the effects of prolonged exposure to nicotine on the performance of rats in the open field task, brain acetylcholinesterase and on their main isoforms activities. The 30 days old rats received injections (s.c.) of saline 0.9% or nicotine 1 mg/kg (8, 10, 12, 14 and 16:00 h; total dose 5 mg/kg/day) during the dark period of the cycle. At 21 days of treatment the animals were submitted to open field 60 min after the last injection. Acetylcholinesterase activity was assayed in total brain, hippocampus and cerebral cortex at 28 days of treatment and in the salt and detergent soluble fractions from hippocampus and cortex, obtained after a differential centrifugation with Triton X-10, at 56 days of treatment.

The exposure to nicotine induced to an absence of open field habituation, since the nicotine exposed rats did not present reduction of rearing response in test session when compared to training, and besides they presented similar number of crossing responses in both sessions. We observed no effect of nicotine on the acetylcholinesterase activity, independently of cerebral region and of molecular form analyzed (salt or detergent soluble, predominance of G1 or G4 form, respectively). As the phobic behavior was not altered (latency to leave the initial area), we can to suggest that nicotine adolescent rats present impairment of habituation memory, without alteration of the AChE activity, an important enzyme of cholinergic system, involved in the acetylcholine hydrolyze efficiency.

*Keywords:* nicotine, acetylcholinesterase, isoforms, young rats, open field.

Running title: Nicotine effects on AChE from brain and behavior of rats.

## 1. INTRODUCTION:

Nicotine is found in wide variety of plants (Doolittle et al., 1995). However, the principal source of nicotine exposure is through the use of tobacco and nicotine replacement therapies such as transdermal nicotine patches and nicotine containing gum (Heishmann et al., 1994). Studies suggest that nicotine is one of the active components in tobacco smoke responsible for tobacco addiction (Stolerman and Jarvis, 1995). Nicotine acts through nicotinic cholinergic receptors that are found in the brain, autonomic ganglia, and the neuromuscular junction (Zevin et al., 1998). The acute effects of nicotine vary depending on nicotine dosage, gender, age and possibly subject strain (Faraday et al., 1999; Cheeta et al., 2001; Elliot et al., 2004).

The drug abuse for humans often begins during adolescence, a period of ontogeny in which individuals exhibit age-specific behavioral characteristics (Spear, 2000). Smoking early in adolescence engenders greater addiction, higher daily consumption of cigarettes and reduced probability of quitting (Chen and Millar, 1998).

Adolescent and adult rats may differ in distribution, density or affinity of central nicotine cholinergic receptors. During the adolescence neurobiological systems are still undergoing important developmental rearrangements, and thus, the pharmacokinetics of nicotine seems to be different in adolescent and adult rats (Trauth et al., 2000). Given these facts, it is somewhat surprising that animal research has largely ignored the adolescence period as a sensitive area for drug abuse issues, concentrating instead on adult effects and on the effects of exposure during fetal or early neonatal development (Kelley and Middaugh, 1999; Trauth et al., 1999; 2000).

Nicotine administration during rats adolescence produces a pattern of nicotinic receptor up regulation of brain regions associated with addiction and reward pathways and this differs from that seen after either gestational or adult exposure (Slotkin and Orband-Miller, 1987; Trauth et al., 1999). Furthermore, adolescent nicotine exposure produces long-term alterations in cell number, macromolecular characteristics, and gene expression, commensurate with brain cell damage (Trauth et al., 1999; 2000). Cell replication, apoptosis, synapse formation and the functional programming of behavioral responses are all consolidated during adolescence (Hunttenlocher, 1990).

It has been reported that nicotine could be able to improve the human cognitive performance, mainly on attention (Stolerman et al., 1995). In rats, Hahn and Stolerman (2002) reported attention enhancement after chronic treatment with nicotine. They suggest that this effect is important for potential therapeutics applications of the drug and as continuous cause for smoking behavior.

Among other nicotine effects on cognitive performance it was verified that small doses of nicotine increased the percentage of correct responses (accuracy), decreased omission errors and reaction time, and increased anticipatory responses. In this way the authors propose that appropriate doses of nicotine can produce robust improvements in performance of normal rats in an attention task (Stolerman et al., 2000). Nicotine initially suppresses locomotor activity in rats. However, chronically, nicotine tends to stimulate activity (Bevins and Besheer, 2001). Rezvani et al. (2004) reported that nicotine significantly decreased locomotor activity in adolescents compared to adult rats.

The vast experimental as well as clinical studies clearly indicate an undisputed major role of acetylcholine in the regulation of cognitive functions (Blockland, 1996);

and the level of this neurotransmitter in the synapses depends, in part, of acetylcholinesterase (AChE). This enzyme is the hydrolase of the acetylcholine in cholinergic synapses and neuromuscular junctions. Its activity is essential for normal cholinergic transmission and neuromuscular function (Al-Jafari & Kamal, 1994).

AChE exists as asymmetric as globular forms; the latter is present in the brain in different multiples of the monomer subunit: monomer, dimer and tetramer (Massoulié et al., 1993). It has also been reported that these isomeric forms are differentially localized in the neuron, the cytosolic form is salt soluble and the membrane bound form is detergent soluble. The most of enzyme molecules in the salt soluble fraction consists of the G1 (monomeric) isomer and in the detergent soluble fraction consists of G4 (tetrameric) along with the other isoforms (Rieger & Vigny, 1976).

Reversible inhibitors of this enzyme have been used as cognitive enhancers in the treatment of Alzheimer's disease and other dementia disorders (Giacobini, 1996). Similarly, nicotine reduces the performance deficits of patients with Alzheimer's disease, attention-deficit/hyperactivity disorder and schizophrenia (Levin & Rezvani, 2000).

Considering the importance of cholinergic system in learning and memory processes, the dependence of this system on AChE activity and the lack of studies with young animals, the objective of this work was evaluate the effects of prolonged nicotine application in the precocious age on performance in the open field task, and on cerebral and on hippocampal and cortical isoforms of AChE activities of rats.

## 2. MATERIALS AND METHODS:

### 2.1 Chemicals:

Acetylthiocholine (ATC), 5-5-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), Tris (hydroxymethyl-d<sub>3</sub>) amino-d<sub>2</sub>-methane, Coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); bovine serum albumin, sodium and potassium phosphate were obtained from Reagen; nicotine 98% was obtained from Aldrich (Germany); Triton X-100 was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2 Animals:

Young male Wistar rats (30 days old) (n=36) obtained from the General Animal House of the UFSM were transferred to our colony room and maintained in groups of 6 in opaque plastic cages, at room temperature ( $23 \pm 2$  °C) for 28 or 56 days. The animals were maintained on an inverted 14-h light/ 10-h dark cycle (lights on from 17:30 until 07:30 h). They had free access to food and water.

### 2.3 Treatment:

All animal manipulations were conducted during the dark period lighted with a red lamp of 40 W in the same colony room. The animals were weighed once a week. The treatment consisted of subcutaneous (s.c.) injections of saline 0.9% or nicotine 5 mg/kg/day, pH 8.0, divided in 5 injections of 1 mL/kg corporal weight (8, 10, 12, 14 and 16:00 h ). At 21 and 22 days of treatment, the animals were subjected to an open field task.

#### 2.4 Open Field task:

The exploratory behavior was investigated in a circular open field, 58 cm X 30 cm diameter and high wall, situated on the room floor. The linoleum floor was marked out into 12 equal areas. The animals were submitted to two sessions, training and test, with interval of the 24 h between them. The sessions started after 60 min of last injection, at 5:00 p.m. Each rat was placed in the central area, in a way to not see the observer. In the succeeding 5 min, the following behaviors were recorded: latency to leave the initial area, crossing (number of areas entered), rearing (incidence of head-lifting on the hind legs either against a vertical surface or unsupported), and number of fecal boluses. The behaviors of exiting the initial area and crossing were considered when the animal placed the four paws in another area. The apparatus was cleaned between the animals with a 35 % ethanol solution. The animals were tested alternating control and nicotine. There were two observers in each session. The task was conducted during the dark period lighted with a 40 W red lamp in the same colony room.

#### 2.5 Tissue and fractions preparation:

After 28 or 56 days of treatment, the animals were anesthetized with ether and killed by decapitation 90 min after the last dose of nicotine or saline. For determination of total AChE activity, total brain, hippocampus and cortex of rats exposed for 28 days were homogenized in Tris-HCl buffer 10 mM pH 7.2 with sucrose 160 mM (1:10, 1:20, and 1:10 w/v, respectively). After centrifugation at 1,000 g for 15 min at 4° C, the supernatant obtained was utilized as enzymatic material.



Hippocampus and cortex fractions of rats exposed for 56 days were prepared for the determination of AChE activity. The hippocampus and cortex was homogenized (1:20 and 1:10, w/v, respectively) in Tris-HCl buffer 10 mM, pH 7.2. Aliquots were collected and the remaining homogenate was centrifuged at 14,500 g for 30 min at 4°C. The supernatant was collected and considered as the salt-soluble AChE (mainly G1 form, Das et al., 2001). The pellet was suspended in a mixture of Triton X-100 1% and sodium phosphate buffer 50 mM, pH 7.2. The suspension was stirred for 10 min at 10°C. After this, it was centrifuged at 43,200 g for 30 min at 4°C. The supernatant was taken as membrane-bound or Triton soluble enzyme (mainly G4 form, Das et al., 2001). The residual pellet was suspended on sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.2, and it was considered the residual enzyme.

### 2.7 Enzyme assay:

AChE activity was determined according to the method of Ellman et al. (1961), modified as described for Pereira et al. (2004). The system contained DTNB 1 mM, sodium phosphate buffer 44.4 mM, pH 7.2, acetylthiocholine 0.8 mM and 50 µL of enzymatic material. It was pre-incubated for 2 min at 30°C and the reaction was started by acetylthiocholine addition. The increase of absorbance was read at 412 nm during 2 min. The specific activity is expressed as µmol ATC hydrolyzed/h/mg protein.

Protein concentration was determined by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) utilizing bovine serum albumin as a standard. All samples were run in triplicate.

### 2.8 Statistical analysis:

The body weight gain and behavioral responses were analyzed by two-way ANOVA, considering the days and session as dependent measure, respectively, following by paired or unpaired Student *t*-test when appropriate. Brain weight and AChE activity were analyzed by unpaired Student *t*-test. Effects were considered significant when  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTS:

#### 3.1. Body and cerebral weights:

The body weight gain is shown in figure 1. Two-way ANOVA, considering the days as repeated measure (treatment x 5 days), revealed no effect of treatment but a significant effect of days [ $F(4,136) = 702.01, p < 0.001$ ] and treatment X days interaction [ $F(4,136) = 6.41, p < 0.001$ ]. The interaction was due to the fact that the nicotine exposed rats presented lower weight gain than that presented by saline animals. However, the significant difference between the two groups only was verified at 28 days of treatment. In relation to brain weight, no significant difference was observed between saline and nicotine groups in both intervals of treatment (data not shown).

#### 3.2. Open field task

The rearing and crossing responses are shown in figure 2. For the rearing responses, the two-way ANOVA, considering the session as repeated measure (treatment X 2 sessions), revealed a significant effect of session [ $F(1, 34) = 12.60, p = 0.001$ ] and of treatment X session interaction [ $F(1, 34) = 7.37, p = 0.01$ ]. For crossing response, the two-way ANOVA, considering the session as repeated measure, revealed significant effects of session [ $F(1, 34) = 20.29, p < 0.001$ ] and of treatment X session interaction [ $F(1, 34) = 9.8, p = 0.004$ ]. The interaction effect for both measurements was due to the fact that the animals treated with nicotine did not present the reduction of response number in the test session in relation to training as showed by saline.

The latency to exit of the initial area and number of fecal boluses were registered in both sessions and showed in the figure 3. Two-way ANOVA showed

significant session effect on latency [ $F(1, 34) = 16.83, p \leq 0.001$ ] and on number of fecal boluses [ $F(1, 34) = 5.59, p < 0.03$ ], but no effect of treatment either treatment x session interaction were observed. Rats from both groups presented lower latency to exit initial area in the test than in the training session, but only nicotine group showed higher number of fecal boluses in test session.

### 3.3 AChE activity

Acetylcholinesterase activity from total brain, hippocampus and cerebral cortex of rats treated with nicotine 5 mg/kg/day for 28 days is shown in figure 4. The statistical analyses (Student *t* test) demonstrated that the treatment did not alter the enzyme activity from different structures.

Aiming to investigate if nicotine could affect a specific isoform of AChE, we evaluated the effect of treatment for 56 days on fractions rich in G1 (salt-soluble) and G4 (detergent-soluble) forms of AChE from hippocampus and cortex. Figure 5 shows the AChE activity of homogenate, salt and detergent-soluble fractions, and residual enzyme of hippocampus and cortex. Student *t*-test revealed that long-term exposure to nicotine did not alter the specific activity in any of fractions studied.

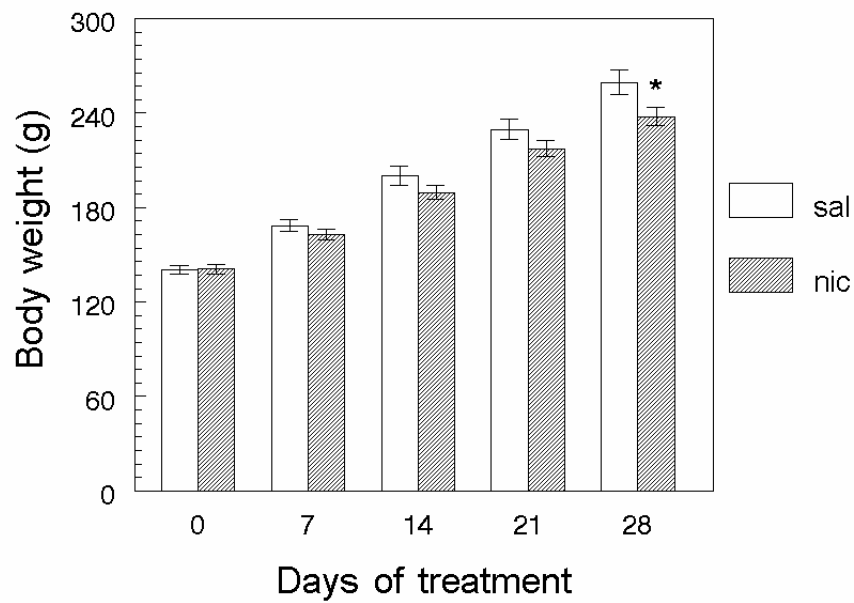


Fig. 1.

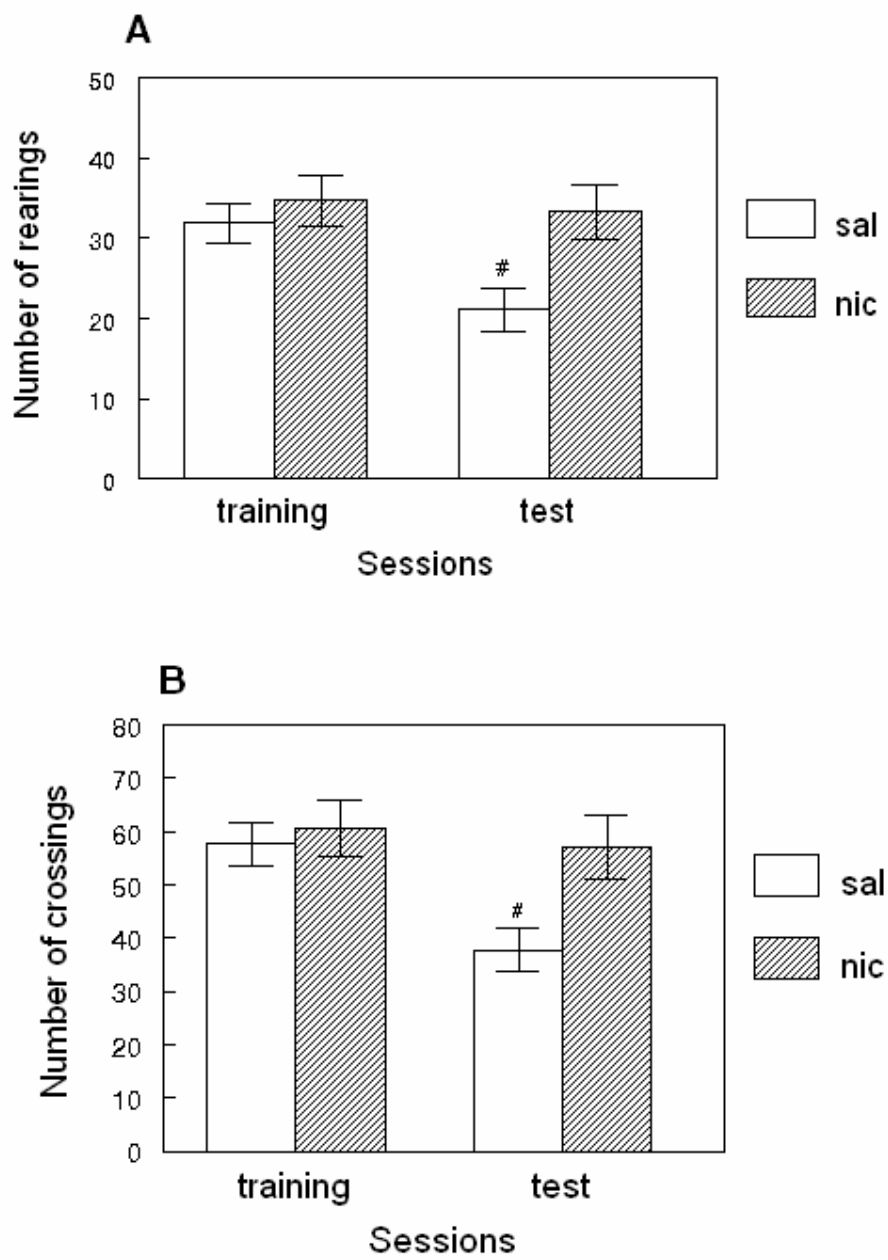


Fig.2.

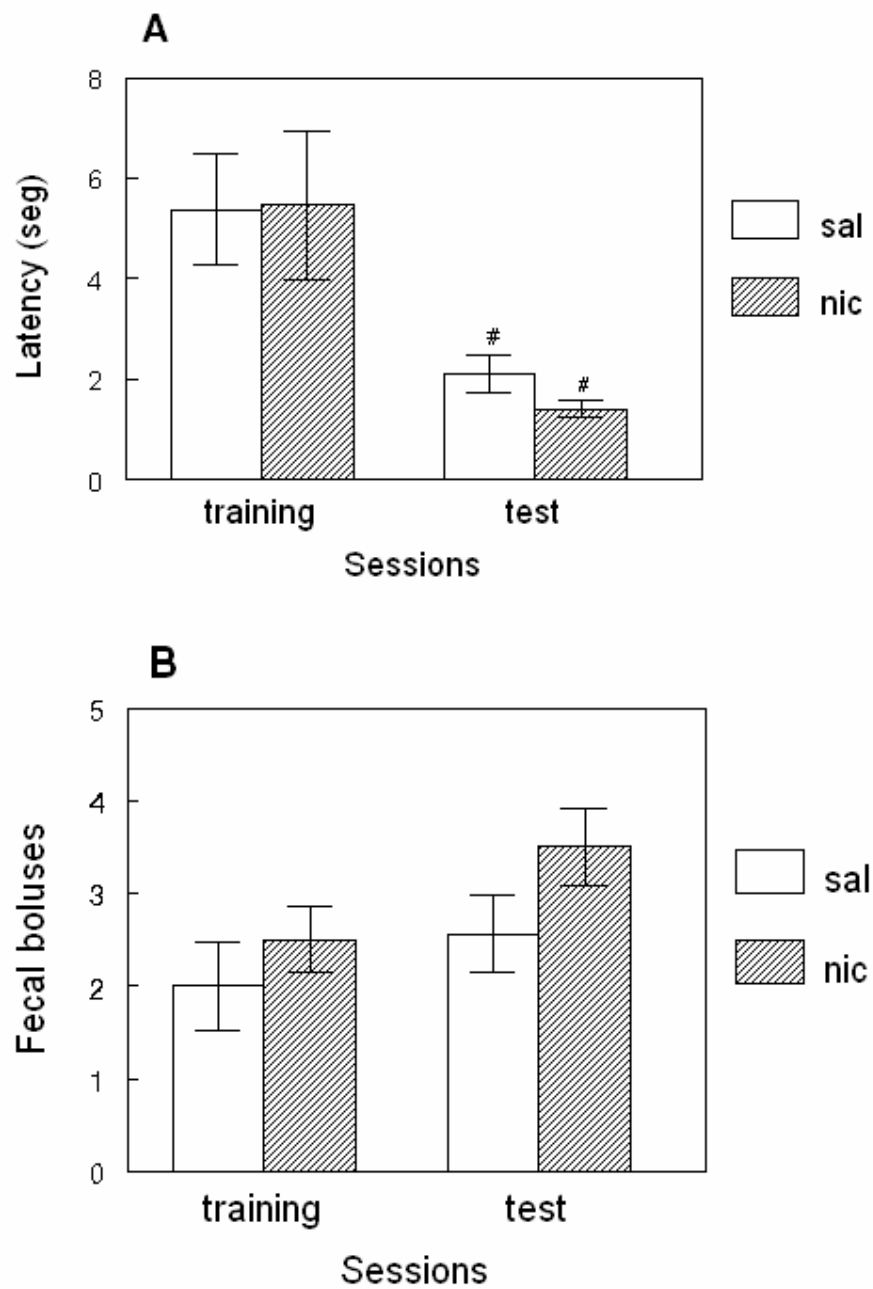


Fig.3.

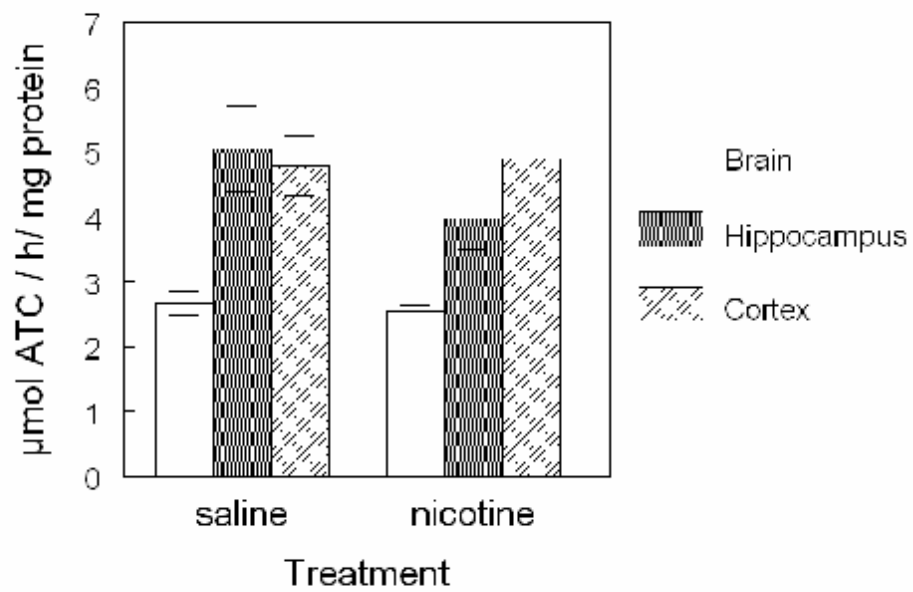


Fig. 4.



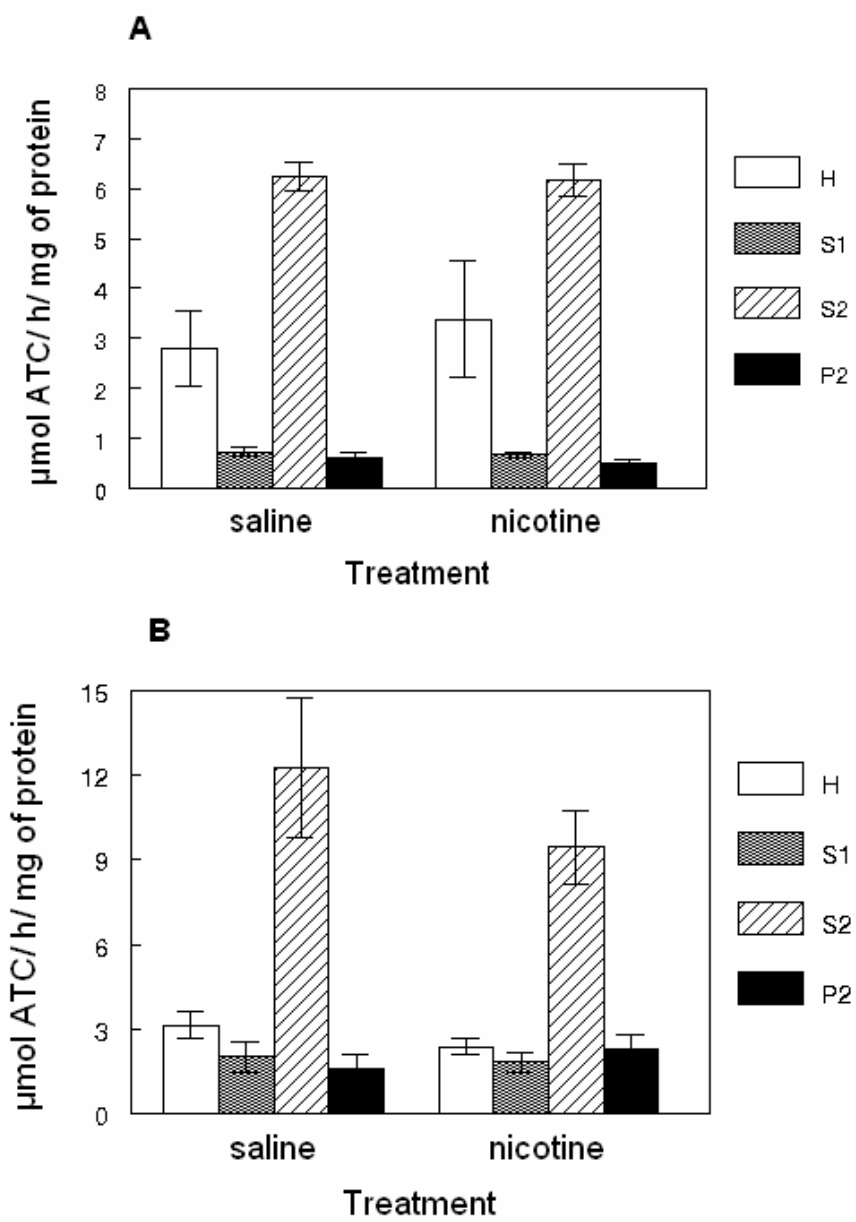


Fig.5.

Fig.1. Body weight gain of rats treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5mg/kg/day (nic) for 28 days. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  compared to saline group. N =18 per group.

Fig. 2. Number of rearing (A) and crossings (B) of rats treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) submitted to two sessions in an open field task. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Significantly different from training session: # $p < 0.001$  (Student *t*-test). N =18 per group.

Fig. 3. Latency to leave the initial area (A) and number of fecal boluses (B) of rats treated with saline 0.9% (sal) or nicotine 5 mg/kg/day (nic) submitted to two sessions in an open field task. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Significantly different from training session: # $p < 0.05$  (Student *t*-test). N =18 per group.

Fig. 4. AChE activities from total brain, hippocampus and cerebral cortex of rats (n= 4-5) treated with saline 0.9% or nicotine 5 mg/kg/day for 28 days. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M.

Fig. 5. AChE activities from hippocampus (A) cerebral cortex fractions (B) of rats (n= 5-6) treated with saline 0.9% or nicotine 5 mg/kg/day for 56 days. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. H= homogenate, S1= salt-soluble fraction, S2= detergent-soluble fraction and P2= residual enzyme.

#### 4. DISCUSSION:

The adolescence is a period of life, both in human and rodents, in which there is intense rearrangement of several functions and systems such as the central nervous system; these features render this phase of development very sensitive to drugs, such nicotine (Hunttenlocher, 1990; Spear, 2000; Slotkin, 2002). Then, the aim of this study was to investigate the effects of prolonged exposure to nicotine in young rats on brain acetylcholinesterase and on its main isoforms activities, and on the performance of rats in the open field task.

The results showed that both groups, saline and nicotine, presented an increase of weight gain, but at 28 days of treatment the body weight of the nicotine group was 8% lower than that of saline group. However, in the moment of behavioral task, e.g., at 21 and 22 days of treatment, the body weights of groups were similar. Nicotine anorexic properties are well documented for adults (Saah et al., 1994; Liu et al., 2003), and the treatment with nicotine causes a significant reduction of body mass growth in neonates (Guan et al., 2004, Huang et al., 2006). Now, we verified that adolescent rats seem also to be sensitive to anorexic effect of nicotine, although the body weight effect presented in this work was subtle.

The role of nicotine was evaluated on performance in the open field. The open field is commonly used to evaluate locomotion, anxiety, and various alterations in emotional behavior. The results revealed that animals treated with nicotine presented an absence of open field habituation, once these animals did not show an improvement of the performance (rearing) on test when compared with training session. Animals treated with nicotine maintained the same ambulatory activity on the test day. These results may be related to stimulatory effect of nicotine on locomotor activity induced by chronic exposure to alkaloid (Bevins and Besheer,

2001), although in the training session the performance of both groups were similar. In relation to neophobic behavior our results show that nicotine did not alter the latency and fecal boluses number in the training session.

Nicotine directly and indirectly impacts many important neurotransmitter systems, such as the cholinergic, serotonergic, dopaminergic, and GABAergic systems (Stolerman and Shoaib, 1991) and many of these systems have been implicated in its reinforcing effects of other abuse drugs. Nicotine exposure during adolescence causes immediate and persistent changes in cholinergic function in brain regions that influence reward, learning and memory (Trauth et al., 2000). Part of the effectiveness of this system is determined by ACh hydrolyze, which are catalyzed by AChE. However, the results of this study show that the AChE activity of total brain, hippocampus and cerebral cortex were not altered for the treatment with nicotine (5 mg/kg/day) for 28 days.

We also determinate the activity of different AChE isomers from different brain structures. The different isoforms of AChE were solubilized in salt (G1; cytosolic) or detergent (G4; membrane bound) (Das et al., 2001). Different brain areas present variable activity and the profile of AChE isoforms showed a varied pattern and it was expected because of extensive cholinergic innervations in the brain regions involved in regulation of different type of functions (Das et al., 2001; 2005). Das et al. (2005) suggested that the inhibition of the G4 isoform of AChE, from area related to learning and memory, such hippocampus, could increase ACh levels, and contribute to learning and memory. The results obtained here showed that the absence of nicotine effects were not dependent on the molecular forms of the AChE. However, the absence of effect on enzyme activity seems not be related to blood level of nicotine (did not measured in this study). Slawecki and Ehlers (2002) showed that

the administration of 5 mg/kg/day nicotine results in a mean blood nicotine levels at 88.5 ng/mL, similar to that presented by smokers. Furthermore, Slotkin et al. (1997) and Xu et al. (2001) reported that administration of 6 mg/kg/day nicotine (via osmotic minipump) to rats produced blood nicotine level higher than that verified in average smokers.

Nicotinic systems play an important role in the neural basis of memory and attention function. Animal models are important for determining the neurobehavioral mechanisms of nicotine effects. Complementary studies would be useful to examine the effects of nicotine exposure on other systems and to determine the mechanism by which this alkaloid induced an absence of habituation.

Acknowledgements: Aline S. José and Carina Franciscato are recipients of fellowships from CAPES; Fabiane Sônego, Micheli Figueiró were fellowships from FAPERGS and CAPES, respectively.

## 5. REFERENCES:

- Al-Jafari, A.A. and Kamal, M. A., 1994. The preparation and kinetic properties of multiple forms of chicken brain acetylcholinesterase. *Cell Biochem. Function.* 12, 29-35.
- Bevins, R.A., Besheer, J., 2001. Individual differences in rat locomotor activity are diminished by nicotine through stimulation of central nicotinic acetylcholine receptors. *Psychology & Behavior.* 72, 237-244.
- Blockland, A. 1996. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res. Rev.* 21, 285-300.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carney, R.M., Goldberg, A.P., 1984. Weight gain after cessation of cigarette smoking. A possible role for adipose tissue lipoprotein lipase. *N. Engl. J. Med.* 310, 614-616.
- Cheeta, S., Irvine, E.E., Tucci, S., Sandhu, J. and File, S.E., 2001. In adolescence, female rats are more sensitive to anxiolytic effect of nicotine than are male rats. *Neuropsychopharmacology.* 25 (4), 601-607.
- Chen, J., Millar, W.J. 1998. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep.* 9, 39-46.
- Das, A., Dikshit, M., Nath, C. 2001. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* 68, 1545-1555.
- Das, A., Dikshit, M., Nath, C. 2005. Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 89-99.
- Doolittle, D.J., Winegar, R., Lee, J.K., Caldwell, W.S., Wallace, A., Hayest, J. & Bethlzy, J.D., 1995. The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat. Res.* 344, 95-102.
- Elliot, B.M., Faraday, M.M., Phillips, J.M., Grunberg, N.E. 2004. Effect of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77, 21-28.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andress Jr., V. & Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Faraday, M.M., Scheufele, P.M., Rahman, M.A., Grunberg, N.E. 1999. Effects of chronic nicotine administration on locomotion depend on rat sex and housing condition. *Nicotine Tob. Res.* 1, 143-151.
- Giacobini, E. 1996. New trends in cholinergic therapy for Alzheimer's disease: nicotin agonists or cholinesterases inhibitors? *Prog. Brain. Res.* 109, 311-323.
- Guan, G., Kramer, S.F., Bellinger, L.L., Wellman, P.J., Kramer, P.R., 2004. Intermittent nicotine administration modulates food intake in rats by acting on nicotine receptors localized to the brainstem. *Life Sci.* 74(22), 2725-2737.
- Hahn, B. and Stolerman, I.P. 2002. Nicotine-Induced attentional enhancement in rats: effects of chronic exposure to nicotine. *Neuropsychopharmacology.* 27(5), 712-722.
- Heisheman, S.C., Taylor, R.C. Hennigfield, J.E., 1994. Nicotine and smoking: a review of effects on human performance. *Exp. Clin. Pharmacol.* 2, 345-395.
- Huang, L.Z., Hsiao, S.-H, Trzeciakowski, J., Frye, G.D., Winzer-Serhan, U.H. 2006. Chronic nicotine induces growth retardation in neonatal rat pups. *Life Sci.* 78, 1483-1493.
- Hunttenlocher, P. R. 1990. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia.* 28, 517-527.
- Kelley, B.M, Middaugh, L.D. 1999. Periadolescent nicotine exposure reduces cocaine reward in adult mice. *J. Addict. Dis.* 18, 27-39.
- Liu, R.-H, Mizuta, M., Matsukura, S., 2003. Long-term oral nicotine administration reduces insulin resistance in obese rats. *Eur. J. Pharmacol.* 458, 227-234.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progr. Neurobiol.* 41, 31-91.
- Maiyata, G., Meguid, M.M., Festssov, S.O., Torelli, G., Kim, H.-J., 1999. Nicotine's effect on hypothalamic neurotransmitters and appetite regulation. *Surgery.* 126, 255-263.
- Pereira, M.E., Adams, A.I.H. and Silva, N.S. 2004. 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicol. Lett.* 146, 269-274.

- Rezvani, A.H. and Levin, E.D. 2004. Adolescent and adult rats respond differently to nicotine and alcohol: motor activity and body temperature. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 22, 349-354.
- Rieger, F. and Vigny, M. 1976. Solubilization and physiochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase: developmental and maturation of its molecular forms. *J. Neurochem.* 27, 121-129.
- Saah, M.I., Raygada, M., Grunberg, N.E., 1994. Effects of nicotine on body weight and plasma insulin in female and male rats. *Life Sci.* 55, 925-931.
- Slawecki, C.J. and Ehkers, C.L. 2002. Lasting effects of adolescent nicotine exposure on the electroencephalogram, event related potentials, and locomotor activity in the rat. *Developmental Brain Res.* 138, 15-25.
- Slotkin, T.A., Orband-Miller, L., Queen, K.L., Whitmore, W.L., Seidler, F.J. 1987. Effects of prenatal nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: maternal drug infusions via osmotic minipumps. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240, 602-611.
- Slotkin, T.A., McCook, E.C, Seidler, F.J., 1997. Cryptic brain cell injury caused by fetal nicotine exposure is associated with persistent elevation of c-fos protooncogene expression. *Brain Res.* 750, 180-188.
- Spear, L.P. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417-463.
- Stolerman, I.P. and Shoaib, M. 1991. The neurobiology of tobacco addiction. *Trends in Pharmacological Sciences.* 12, 467-473.
- Stolerman, I.P., Mirza, N.R., Shoaib, M. 1995. Nicotine psychopharmacology: addiction, cognition and neuroadaptation. *Med. Res. Rev.* 15, 47-72.
- Stolerman, I.P., Jarvis, M.J. 1995. The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology.* 117, 2-10.
- Stolerman, I.P., Mirza, N.R., Hahn, B., Shoaib, M. 2000. Nicotine in an animal model of attention. *Eur. J. Pharmacol.* 393, 147-154.
- Trauth, J.A., Seidler, F.J., McCook, E.C, Slotkin, T.A. 1999. Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions. *Brain Res.* 851, 9-19.



- Trauth, J.A., Seidler, F.J., Slotkin, T.A. 2000. Persistent and delayed behavioral changes alter nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res.* 880, 167-172.
- Yildiz, D., 2004. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol.* 43, 619-632.
- Xu, Z., Seidler, F.J., Slikker Jr W., Slotkin, T.A., 2001. Fetal and adolescent nicotine administration: effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res.* 914, 166-178.
- Zevin, S., Gourlay, S.G., Benowitz, N.L., 1998. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin. Dermatol.* 16, 557-564.

#### 4. DISCUSSÃO GERAL:

Estudos têm demonstrado que a adolescência compreende um período em que o cérebro continua em desenvolvimento; replicação celular, apoptose, formação sináptica e a formação das respostas comportamentais são consolidadas durante este período (HUNTENLOCHER, 1990 *apud* TRAUTH et al. 2000).

Quando o hábito de fumar inicia-se na adolescência há um maior consumo diário, assim como uma menor probabilidade de abandono do vício (CHEN & MILLER, 1998).

Desta forma, avaliar os efeitos da exposição, de ratos considerados adolescentes, à nicotina por um período de 28 ou 56 dias, sobre a atividade das enzimas: acetilcolinesterase (cerebral e sangüínea) e porfobilinogênio-sintase (hepática e sanguínea) e sobre o comportamento de animais jovens torna-se de grande importância.

Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição à nicotina na dose de 5 mg/kg/dia ocasiona redução no ganho de peso corporal e hepático. O peso corporal apresentado pelos animais tratados com nicotina por um período de 28 dias, foi apenas 8 % menor do que o observado para o grupo controle, já aos 56 dias de tratamento observa uma redução de 14% no peso corporal destes animais. A redução do peso hepático pôde ser observada aos 56 dias de tratamento (19,7%). Wellman et al. (2005) relatam que o peso corporal de ratos tratados por um período de 14 dias com nicotina é menor do que o observado para o grupo controle, mesmo havendo um consumo calórico similar. O mecanismo cerebral, através do qual a nicotina possa inibir o apetite ainda é desconhecido, embora haja evidências de que a nicotina induza a uma hipofagia através da ativação dos receptores nicotínicos no tecido cerebral, ocasionando posterior liberação de dopamina e serotonina (GUAN et al., 2004).

Neste estudo os níveis de glicose não foram alterados, mas os níveis de glicogênio hepático apresentaram-se diminuídos. Os animais que foram expostos à nicotina por 28 dias possuem níveis de glicogênio 39,9% menores do que o grupo controle e os animais que foram expostos por um período mais longo (56 dias) demonstraram uma redução de 45% nos níveis de glicogênio hepático em relação ao grupo controle. Existem trabalhos que relatam que a nicotina não altera a

tolerância à glicose ou mesmo a ação da insulina (EPIFANO et al., 1992). Mas também há relatos de que este mesmo alcalóide possa diminuir a secreção e os níveis basais de insulina (SAAH et al., 1994). Liu et al. (2003) relata decréscimo no peso hepático de ratos após tratamento com nicotina e também demonstra que há decréscimo nos níveis de glicogênio.

O papel da nicotina no desempenho na tarefa do campo aberto foi avaliado neste trabalho. Os resultados obtidos demonstram que animais jovens tratados com nicotina apresentam ausência de habituação, já que esses não apresentaram uma melhora no desempenho (respostas de orientação e locomoção) na sessão de teste em relação à sessão de treino. Sabe-se que animais tendem a locomover-se mais quando o ambiente em que se encontram é novo do que quando este lhes é familiar (MENZAGHI et al., 1994). Estes resultados podem estar correlacionados ao efeito estimulador sobre a locomoção induzido pelo tratamento crônico com nicotina (BEVINS & BESHEER, 2001). O comportamento neofóbico dos animais não foi alterado pelo tratamento com nicotina, uma vez que os animais tratados e os animais controle apresentaram tempo de saída da primeira área e número de bolos fecais semelhantes.

O fato de não termos encontrado uma inibição sobre a atividade da enzima PBG-sintase hepática e sanguínea é de certa forma não esperado, uma vez que, Dowla et al. (1996) relata a inibição *in vitro* da PBG-sintase eritrocitária humana e Panemangalore et al. (1999) a inibição *in vivo* desta enzima pela nicotina. Silva & Pereira (2004) relatam que a enzima PBG-sintase eritrocitária humana não se apresenta modificada em doadores fumantes.

Dowla et al. (1996) e Panemangalore et al. (1999) relatam a ausência de inibição da enzima ChE plasmática humana *in vitro*, mas demonstram sua inibição *in vivo*. No presente estudo não observamos efeito da nicotina sobre a atividade da AChE sanguínea. Figueiró (2005) demonstrou que a atividade da AChE de cérebro de ratas, sangue humano e purificada de órgão elétrico de enguia é inibida *in vitro* pela nicotina.

Embora Chang et. al. (1973) relatem a inibição da AChE de cérebro de ratos tratados com nicotina (1 mg/kg/dia) por um período de 8 ou 16 semanas, os resultados obtidos no presente trabalho para a atividade da AChE de cérebro total, hipocampo e córtex de animais tratados por 28 dias (5 mg nicotina/kg/dia) demonstram ausência de efeito da nicotina sobre a atividade desta enzima.

Existem diversos estudos sobre os vários aspectos bioquímicos da AChE, mas informações em relação a suas isoformas (G1 e G4), as quais estão envolvidas no estresse e no desempenho cognitivo e conseqüentemente seu envolvimento na memória e aprendizado, ainda são escassas (DAS et al., 2005).

A atividade das diferentes isoformas da AChE de hipocampo e córtex foi avaliada no presente estudo. As isoformas estudadas foram G1 e G4, fração solúvel em sal e fração solúvel em detergente, respectivamente (DAS et al. 2001). Os resultados obtidos demonstram ausência de efeito da nicotina sobre as diferentes isoformas da AChE de hipocampo e córtex cerebral. Podemos assim, supor que a ausência de efeito sobre a atividade desta enzima seja independente da forma molecular. Uma vez que as diferentes isoformas da enzima possuem características específicas e respondem de maneira diferente a inibidores da AChE (OGANE et al., 1992).

Os resultados do presente estudo demonstram que os efeitos da nicotina parecem muito específicos, prejudicando o crescimento e o armazenamento de energia na forma de glicogênio e a habituação a um campo aberto, porém não interferindo nas respostas de marcadores sensíveis a diversos agentes tóxicos, como a atividade da acetilcolinesterase e da PBG-sintase.

## 5. CONCLUSÕES:

Tendo em vista os objetivos do presente trabalho, pode-se concluir que:

- Em relação ao ganho de peso corporal, os animais expostos à nicotina apresentaram um decréscimo no ganho de peso aos 28 e 56 dias de tratamento;
- O peso do fígado dos animais tratados com nicotina apresentou-se menor do que o observado para os animais controle aos 56 dias de tratamento;
- Os níveis de glicose plasmática não foram alterados pelo tratamento com nicotina por 28 ou 56 dias;
- Os níveis de glicogênio hepático, dos animais que receberam nicotina encontraram-se diminuídos, tanto para o tratamento por 28 dias quanto por 56 dias;
- Para a tarefa comportamental observou-se que os animais tratados com nicotina demonstram uma ausência de habituação, uma vez que estes não obtiveram uma melhora no desempenho (resposta de orientação e cruzamentos) na sessão de teste quando comparada à sessão de treino;
- Os animais controle e os tratados com nicotina apresentaram uma diminuição similar no tempo de saída da primeira área, mostrando assim que o comportamento fórbico não foi alterado. O grupo tratado com nicotina apresentou um aumento no número de bolos fecais na sessão teste;
- As enzimas PBG-sintase hepática e sanguínea e AChE sanguínea dos ratos expostos a nicotina por 28 ou 56 dias não apresentaram nenhuma modificação em suas atividades, comparando-as ao grupo controle;
- Em relação à atividade da enzima AChE de cérebro total, hipocampo e córtex cerebral dos animais tratados por um período de 28 dias, podemos concluir que a nicotina na dose de 5 mg/kg/dia, não alterou a atividade desta enzima;
- A atividade das isoformas da enzima AChE, tanto de hipocampo quanto de córtex, não foi alterada com o tratamento por 56 dias, demonstrando que a ausência de efeito é independente das isoformas estudadas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AFONSO, S.G., DE SALAMANCA, R.E., BATTLE, A., 1997. Folding and unfolding of delta-aminolevulinic acid dehydratase and porphobilinogen deaminase induced by uro-and protoporphyrin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 493-503.
- AL-JAFARI, A.A. AND KAMAL, M. A., 1994. The preparation and kinetic properties of multiple forms of chicken brain acetylcholinesterase. *Cell Biochem. Function.* 12, 29-35.
- BEVINS, R.A., BESHEER, J., 2001. Individual differences in rat locomotor activity are diminished by nicotine through stimulation of central nicotinic acetylcholine receptors. *Physiol. Behav.* 72, 237-244.
- BENOWITZ, N.L. & JACOB, P., 1984. Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* 35, 499-504.
- BLOCK, C., LOHMANN, R.D., BEYERSMANN, D., 1990. Probing of active site residues of the zinc enzyme 5-aminolevulinic acid dehydratase by spin and fluorescent labels. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 371, 1145-1152.
- CASHMAN, J.R., PARK, S.B., YANG, Z.C., WRIGTON, S.A., JACOB, P., BENOWITZ, N.L., 1992. Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of trans- nicotine N'oxide. *Chem. Res. Toxicol.* 5 (2), 639-646.
- CASTELFRANCO, P.A., BERGS, L., SALAMANCA, R.E. AND BATTLE, A.M., 1983. Aminolevulinic acid dehydratase: Properties and mechanism of action. *N. Arch. Fac. Med.* 45, 61-70.
- CHANG, P.L., BHAGAT, B. AND TAYLOR, J.J., 1973. Effect of chronic administration of nicotine on acetylcholinesterase activity in the hypothalamus and medulla oblongata of the rat brain. An ultrastructural study. *Brain Res.* 54, 75-84.
- CHEN, J., MILLAR, W.J., 1998. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep.* 9, 39-46.

- DAJAS-BAILADOR, F. & WONNACOTT, S., 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (6), 317-324.
- DAS, A., DIKSHIT, M., NATH, C., 2001. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* 68, 1545-1555.
- DOOLITTLE, D.J., WINEGAR, R., LEE, J.K., CALDWELL, W.S., WALLACE, A., HAYEST, J. & BETHLZY, J.D., 1995. The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat. Res.* 344, 95-102.
- DOWLA, H.A., PANEMANGALORE, M., BYERS, M.E., 1996. Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma *in vitro* by agricultural chemicals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 107-114.
- ELIASSON, B., TASKINEN, M.R., SMITH, U., 1996. Long term use of nicotine gum is associated with hyperinsulinemia and insulin resistance. *Circulation.* 94, 878-881.
- EMANUELLI, T., ROCHA, J.B.T, PEREIRA, M.E., PORCIÚNCULA, L.O., MORSCH, V.M., MARTINS, A.F., SOUZA, D.O., 1996. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinatase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol. Toxicol.* 9, 136-143.
- EPIFANO, L., DI VICENZO, A., FANELLI, C., PORCELLATI, F., PERRIELLO, G., DE FEO, P., MOTOLESE, M., BRUNETTI, P., BOLLI, G.B., 1992. Effect of cigarette smoking and of a transdermal nicotine delivery system on glucoregulation in type 2 diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43, 257-263.
- FIGUEIRÓ, M., 2005. Sensibilidade da enzima acetilcolinesterase (E.C. 3.1.1.7) à nicotina *in vitro* e *ex vivo*. 100 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
- GIBSON, K.D., NEUBERGER, A., SCOTT, J.J., 1955. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.* 61, 618-629.
- GOURLAY, S.G. & BENOWITZ, N.L., 1997. Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray and intravenous nicotine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 62, 453-463.

- HAHN, B., STOLERMAN, I.P., 2002. Nicotine-induced attentional enhancement in rats: effects of chronic exposure to nicotine. *Neuropsychopharmacology*. 27, 712-722.
- HEISHEMAN, S.C., TAYLOR, R.C. HENNIGFIELD, J.E., 1994. Nicotine and smoking: a review of effects on human performance. *Exp. Clin. Pharmacol.* 2, 345-395.
- HUKKANEN, J., JACOB III, P., BENOWITZ, N.L., 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol. Rev.* 57, 79-115.
- JAFFE, E.K., 1995. The porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 169-179.
- KALCHER, K., KERN, W., PIETSCH, R., 1993. Cadmium and lead in smoke of a filter cigarette. *Sci. Total Environ.* 128, 21-35.
- LEVIN, E.D. & ROSE, J.E., 1991. Nicotinic and muscarinic interactions and choice accuracy in the radial-arm maze. *Brain Res. Bull.* 27, 125-128.
- LEVIN, E.D. & TORRY, D., 1996. Acute and chronic nicotine effects on working memory in aged rats. *Psychopharmacology*. 123, 88-97.
- LEVIN, E.D. & SIMON, B.B., 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*. 138, 217-230.
- LEVIN, E.D. & REZVANI, A.H., 2000. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 393, 141-146.
- LIU, R.-H, MIZUTA, M., MATSUKURA, S., 2003. Long-term oral nicotine administration reduces insulin resistance in obese rats. *Eur. J. Pharmacol.* 458, 227-234.
- MACIEL, E.M., BOLZAN, R.C., BRAGA, A.L. & ROCHA, J.B.T., 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl diteluride differentially affects  $\delta$ - aminolevulinatase from liver, kidney and brain mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 310-319.



- MAIYATA, G., MEGUID, M.M., FESTSSOV, S.O., TORELLI, G., KIM, H.-J., 1999. Nicotine's effect on hypothalamic neurotransmitters and appetite regulation. *Surgery*. 126, 255-263.
- MASSOULIÉ, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, E., VALLETTE, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progr. Neurobiol.* 41, 31-91.
- MCBRIDE, J.S., ALTMAN, D.G., KLEIN, M., WHITE, W. 1998. Green tobacco sickness. *Tob. Control.* 7, 294-298.
- MESSINA, E.S., TYNDALE, R.F., SELLERS, E.M., 1997. A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 1608-1614.
- NAKAJIMA, M., YAMAMOTO, T., NUNOYA, K., YOKOI, T., NAGASHIMA, K., INOUE, K., FUNAE, Y., SHIMADA, N., KAMATAKI, T., KUROIWA, Y., 1996. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab. Dispos.* 24, 1212-1217.
- NAKAYAMA, H., OKUDA, H., NAKASHIMA, T., IMAOKA, S., FUNAE, Y., 1993. Nicotine metabolism by rat hepatic cytochrome P450s. *Biochem. Pharmacol.* 45, 2554-2556.
- NUNES-TAVARES, N., MATTA, A.N., BATISTA E SILVA, C.M., ARAUJO, G.M.N., LOURO, S.R.W., HASSON-VOLOCH, A., 2002. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1071-1079.
- OGANE, N., GIACOBINI, E., STRUBLE, R., 1992. Differential inhibition of acetylcholinesterase molecular forms in normal and Alzheimer disease brain. *Brain Res.* 589, 307-312.
- PANEMANGALORE, M., DOWLA, H.A., BYERS, M.E., 1999. Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 72, 84-88.
- PAULY, J.R., SPARKS, J.A., HAUSER, K.F., PAULY, T.H., 2004. In utero nicotine exposure causes persistent, gender-dependent changes in locomotor activity and sensitivity to nicotine in C57 B1/6 mice. *Int. J. Neuros.* 22, 329-337.

- PEIXOTO, N.C., ROZA, T., FLORES, E.M.M, PEREIRA, M.E., 2003. Effects of zinc and cadmium on HgCl<sub>2</sub>-δ-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol. Lett.* 146, 17-25.
- PEIXOTO, N.C., ROZA, T., PEREIRA, M.E., 2004. Sensitivity of δ-ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of rats to metals in vitro depends on the stage of postnatal growth and tissues. *Toxicol. in vitro.* 18, 805, 809.
- PERKINS, K.A., 1992. Metabolic effects of cigarette smoking. *J. Appl. Physiol.* 72, 401-409.
- PERREY, D.C., DAVILA-GARCIA, M.I, STOCKMEIER, C.A., KELLAR, K.J., 1999. Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1545-1552.
- PORCHET, H.C., BENOWITZ, N.L., SHEINER, L.B., COPELAND, J.R., 1987. Apparent tolerance to the acute effect of nicotine results in part from distribution kinetics. *J. Clin. Invest.* 80, 1466-1471.
- PRADO, M.A.M., REIS, R. A. M., PRADO, F. V., MELLO, M. C. GOMEZ, M. V., MELLO, F. G., 2002. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem. Int.* 41, 291-299.
- RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K., 2004. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. (Ed.). *Farmacologia*. Elsevier, São Paulo, Brasil, p. 676-695.
- REZVANI, A.H. & LEVIN, E.D., 2004. Adolescent and adult rats respond differently to nicotine and alcohol: motor activity and body temperature. *Int. J. Devl. Neuros.* 22, 349-354.
- ROCHA, J.B.T, FREITAS, A.J., MARQUES, M.B., PEREIRA, M.E., EMANUELLI, T., SOUZA, D.O., 1993. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26, 1077-1083.
- ROCHA, J.B.T, PEREIRA, M.E., EMANUELLI, T., CHRISTOFARI, R.S., SOUZA, D.O., 1995. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ-aminolevulinic acid

dehidratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. Toxicology. 100, 27-37.

- ROCHA, J.B.T, ROCHA, L.K, EMANUELLI, T., PEREIRA, M.E., 2001. Effect of mercuric chloride and lead acetate treatment during the second stage of rapid post-natal brain growth on the behavioral response to chlorpromazine and on  $\delta$ -ALA-D activity in weaning rats. Toxicol. Lett. 125, 143-150.
- SAAH, M.I., RAYGADA, M., GRUNBERG, N.E., 1994. Effects of nicotine on body weight and plasma insulin in female and male rats. Life Sci. 55, 925-931.
- SAHAKIAN, B., JONES, G., LEVY, R., GRAY, J., WARBURTON, D., 1989. The effects of nicotine on attention, information, processing, and short-term memory in patients with dementia of the Alzheimer type. Br. J. Psychiat. 154, 797-800.
- SCHEVELBIEN, H., 1982. Nicotine, resorption and fate. Pharm. Ther. 18, 233-248.
- SILVA, P. Farmacologia. 1998. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1314p.
- SILVA, V.B.M., PEREIRA, M.E., 2004. Parâmetros hematológicos e toxicológicos em amostras de sangue de doadores fumantes. Rev. Bras. Anal. Clin. 37(2), 97-101.
- SILVA, V.B.M., 2006. Parâmetros hematológicos e toxicológicos em amostras de sangue de doadores fumantes e efeito da nicotina *in vitro*. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
- SLOTKIN, T.A., 2002. Nicotine and the adolescent brain: Insights from an animal model. Neurotoxicol. Teratol. 24, 369-384.
- SOHN, M., HARTLEY, C., FROELICHER, E.S., BENOWITZ, N.L., 2003. Tobacco use and dependence. Semin. Oncol. Nurs. 19, 250-260.
- SPEAR, L.P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. Neurosci. Biobehav. Rev. 24, 417-463.

- STOLERMAN, I.P., MIRZA, N.R., SHOAB, M., 1995. Nicotine psychopharmacology: addiction, cognition and neuroadaptation. *Med. Res. Rev.* 15, 47-72.
- STOLERMAN, I.P., MIRZA, N.R., HAHN, B., SHOAB, M., 2000. Nicotina in an animal model of attention. *Eur. J. Pharmacol.* 393, 147-154.
- SWISLOCKI, A.L.M., TSUZUKI, A., TAIT, M., KHUU, D., FANN, K., 1997. Smokeless nicotine administration is associated with hypertension but not with a deterioration in glucose tolerance in rats. *Metabolism.* 46, 1008-1012.
- TAYLOR, P., 1996. Anticholinesterase agents. In: Hardman, J.G., Gilman, A.G. & Limbird, L.E. (Ed.). *The Pharmacologic Basis of Therapeutics.* McGraw-Hill, New York, USA, p.161-176.
- TAYLOR, P. & BROWN, J.H., 1999. Acetylcholine. In: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. & Molinoff, P.B. (Ed.). *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and Medical Aspects.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A, p. 214-242.
- TRAUTH, J.A., SEIDLER, F.J., SLOTKIN, T.A., 2000. Persistent and delayed behavioral changes alter nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res.* 880, 167-172.
- USDHHS (U.S. Department of Health and Human Services). 2000. Reducing tobacco use: a report of the surgeon general. Centres for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, Atlanta, GA, USA.
- WELLMAN, P.J., BELLINGER, L.L., CEPEDA-BENITO, A., SUSABDA, A., HO, D.H., DAVIS, K.W. 2005. Meal patterns and body weight alter nicotine in rats as a function of chow or high-fat diet. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 627-634.
- YILDIZ, D., 2004. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol.* 43, 619-632.
- ZEVIN, S., JACOB, P., BENEWITZ, N.L., 1997. Cotinine effects on nicotine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 58-66.
- ZEVIN, S., GOURLAY, S.G., BENEWITZ, N.L., 1998. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin. Dermatol.* 16, 557-564.