



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Monique Corrêa Santos

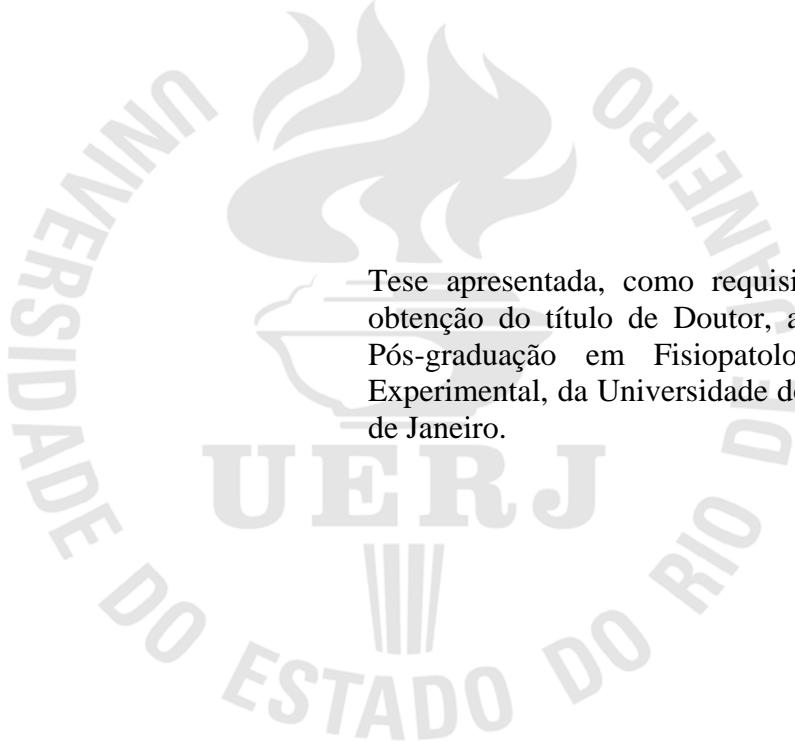
**Efeitos da exposição de camundongos adolescentes à fumaça de cigarros
contendo diferentes níveis de nicotina: alterações bioquímicas e
comportamentais**

Rio de Janeiro

2014

Monique Corrêa Santos

Efeitos da exposição de camundongos adolescentes à fumaça de cigarros contendo diferentes níveis de nicotina: alterações bioquímicas e comportamentais



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

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

Coorientador: Prof Dr. Anderson Ribeiro Carvalho

Rio de Janeiro

2014

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

M237 Santos, Monique Corrêa.

Efeitos da exposição de camundongos adolescentes à fumaça de cigarros contendo diferentes níveis de nicotina: alterações bioquímicas e comportamentais / Monique Corrêa Santos. – 2014.

121 f.

Orientadora: Yael de Abreu Villaça.

Coorientador: Anderson Ribeiro Carvalho.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Fumo e juventude - Teses. 2. Adolescentes - Teses. 3. Sistema Nervoso Simpático - Efeitos de drogas. 4. Comportamento do adolescente - Efeito de drogas. 5. Nicotina - Teses. 6. Transtorno por Uso de Tabaco - Fisiopatologia. 7. Receptores Nicotínicos - Fisiologia. I. Villaça, Yael de Abreu. II. Carvalho, Anderson Ribeiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 613.84-053.6

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

Assinatura

Data

Monique Corrêa Santos

Efeitos da exposição de camundongos adolescentes à fumaça de cigarros contendo diferentes níveis de nicotina: alterações bioquímicas e comportamentais

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de Maio de 2014.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Yael de Abreu Villaça (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof Dr. Anderson Ribeiro Carvalho (Coorientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^ª. Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Claudio Alberto Serfaty

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Thomas Eichenberg Krahe

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por tudo o que me concedeste até agora.

A minha família, por sempre estarem ao meu lado, me dando apoio e segurança. Obrigada mãe, pai e Naldo vocês são muito importantes para mim.

A Dely, por ter participado de toda a trajetória. Obrigada pelo amor e companheirismo, por todos os momentos de alegria e distração, e pela paciência e compreensão nos momentos críticos.

A minha orientadora, Yael pelo apoio e conhecimento que me foi dado durante a realização deste trabalho. Ao meu co-orientador Anderson por sua atenção e ajuda. Ao professor Alex e professor Cláudio por todo apoio, incentivo.

Ao grupo de bioquímica, nada teria acontecido sem o empenho e dedicação de cada um, Anderson, André, Cristiane, Danielle e Povis. Vocês foram muito parceiros.

A todos do laboratório de Neurofisiologia, que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado durante todo tempo. Bruna, Fernanda, Gabi, Jeferson, Jemima, Juliana Big Field, Juliana Acari, Sylvio o convívio com vocês foi muito divertido, sentirei falta de cada um.

Aos meus amigos e familiares, que acompanharam essa trajetória. Obrigada pelo apoio.

.

O essencial é invisível aos olhos.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

SANTOS, Monique Corrêa Santos. *Efeitos da exposição de camundongos adolescentes à fumaça de cigarros contendo diferentes níveis de nicotina: alterações bioquímicas e comportamentais*. 2014. 121 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Consumo de tabaco é um dos mais importantes desafios de saúde pública. Apesar disso, há poucos estudos experimentais que investiguem os efeitos da exposição à fumaça de tabaco durante a adolescência. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da fumaça gerada a partir de cigarros contendo altos ou baixos níveis de nicotina no comportamento e no sistema colinérgico de camundongos expostos durante a adolescência. Foram utilizados camundongos Suíços de ambos os sexos e expostos a fumaça do dia pós natal (PN) 30 a 45 (exposição do corpo inteiro de 8 horas/dia e 7 dias/semana) gerada a partir de cigarros de referência para pesquisa tipo 2R1F (grupo AltaNic – 1,74 mg/cigarros) ou tipo 4A1 (grupo BaixaNic - 0,14 mg/cigarros). Camundongos Controle (CT) foram expostos a ar corrente. Ao final da exposição (PN45), nós avaliamos os níveis de cotinina sérica (metabólito da nicotina) de um grupo separado de camundongos. No final da exposição (PN44-45), durante o curto período (PN49-50) e longo período (PN74-75) de retirada, os camundongos foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado, e ao teste do campo vazado. Não existiram diferenças na ansiedade entre os grupos no labirinto em cruz. No campo vazado, os efeitos foram dependentes do tipo de cigarro utilizado. No final do período de exposição, os animais AltaNic exploraram um número maior de orifícios e camundongos BaixaNic exploraram menos orifícios quando comparado aos animais CT. Durante o curto período de retirada, camundongos BaixaNic ainda exploraram menos orifícios enquanto, durante o longo período de retirada, existiu um aumento tardio na exploração em fêmeas AltaNic. Quanto ao sistema colinérgico, foram quantificados a ligação ao receptor de colinérgico nicotínico (nAChR), a ligação do [(3)H]hemicholinio-3 (HC-3) ao transportador pré-sináptico de colina, a atividade da colina acetiltransferase (ChAT) e da acetilcolinesterase (AChE) no córtex cerebral de camundongos decapitados após o último teste comportamental. Ambos os grupos apresentaram aumento na expressão dos nAChRs durante a exposição, no entanto, estes efeitos não persistiram durante a retirada. Os efeitos na ligação ao HC-3 e ChAT foram sexo-dependentes. Em relação ao HC-3, os efeitos foram identificados durante a retirada: no curto período, camundongos machos BaixaNic e AltaNic apresentaram aumento na ligação, enquanto, em fêmeas, ocorreu diminuição. Distintamente, no longo período de retirada, machos do grupo BaixaNic apresentaram diminuição, e um aumento foi evidente em fêmeas do grupo AltaNic. Ao final do período de exposição, a atividade da ChAT estava diminuída em machos do grupo BaixaNic. A diminuição foi seguida por um efeito tardio de aumento da atividade em machos do grupo AltaNic durante o curto período de retirada. Atividade da AChE não foi afetada durante ou após o término da exposição. Estes resultados indicam que a exposição à fumaça de cigarro altera a busca por novidades como também, causa alterações em biomarcadores da função colinérgica. O padrão de mudança depende do tipo de cigarro

Palavras-chave: Adolescente. Cigarro. Comportamento. Sistema colinérgico.

ABSTRACT

SANTOS, Monique Corrêa Santos. *Effects of adolescent mice exposed to cigarette smoke with different levels of nicotine: biochemical and behavioral*. 2014. 121 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Tobacco consumption is one of the most important public health challenges. Despite that, there is a lack of experimental studies that investigate the effects of tobacco smoke exposure during adolescence. The current study was undertaken to investigate the effects of tobacco smoke generated from cigarettes containing either high or low levels of nicotine in the behavior and cholinergic system of mice exposed during adolescence. From postnatal day (PN) 30 to 45, Swiss mice of both sexes were exposed to tobacco smoke (whole body exposure for 8 hr/day and 7 days/week) generated from one of two reference research cigarettes: type 2R1F (HighNIC group - nicotine = 1.74 mg/cigarette) or type 4A1 (LowNIC group - nicotine = 0.14 mg/cigarette). Control mice (CT) were exposed to current air. At the end of the exposure period (PN45) we assessed the levels of cotinine (nicotine metabolite) in serum of a separate group of mice. By the end of exposure (PN44-45), during short-term (PN49-50) and long-term withdrawal (PN74-75), mice were submitted to the elevated plus maze and hole board tests. There were no differences in anxiety among groups in the maze. In the hole board, the effects were largely dependent on the type of cigarette. By the end of the exposure period, HighNic animals explored a larger number of holes and LowNic mice explored fewer holes when compared to CT animals. During a short-term withdrawal, LowNic mice still explored fewer holes while, during long-term withdrawal, there was a late-emergent increase in exploration in HighNic females. Regarding the cholinergic system, we assessed nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) binding, [(3)H]hemicholinium-3 (HC-3) binding to the high-affinity choline transporter, choline acetyltransferase (ChAT), and acetylcholinesterase (AChE) activities in the cerebral cortex of mice decapitated after the last behavioral test. Both Low and HighNic mice presented nAChR upregulation during exposure, however, this effect failed to persist at withdrawal. Effects on HC-3 binding and ChAT were sex-dependent. Regarding HC-3, effects were identified during withdrawal: In the short-term, while male mice from both Low and HighNic groups presented increased binding, it was decreased in females. Distinctively, in the long-term, a late-emergent decrease was identified in LowNic males and an increase was evident in HighNic females. ChAT activity was decreased in Low and HighNic males by the end of exposure. The decrease was followed by late-emergent increased activity in HighNic males during a short-term withdrawal. AChE activity was not affected by tobacco smoke exposure and withdrawal. These results indicate that exposure to cigarette smoke affects novelty seeking behavior and alters biomarkers of cholinergic function. The pattern of changes depends on the type of cigarette.

Keywords: Adolescent. Cigarette. Behavior. Cholinergic System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Foto da máquina de queima de cigarro.....	28
Figura 2 –	Foto em vista superior do labirinto em cruz elevado.....	
Figura 3 –	Ilustração representando o equipamento utilizado no teste do campo vazado	30 32
Figura 4 –	Linha temporal.....	36
Figura 5 –	Massa corporal dos animais.....	39
Figura 6 –	Percentual de tempo e entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE)	42
Figura 7 –	Atividade locomotora no labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	43
Figura 8 –	Número de orifícios explorados no campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	45
Figura 9 –	Atividade locomotora no campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	46
Figura 10 –	Atividade vertical no labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	49
Figura 11 –	Auto-limpeza no labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	51
Figura 12 –	Alongamentos em direção aos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	52
Figura 13 –	Tempo de permanência no centro do labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	53
Figura 14 –	Atividade vertical no campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.	54
Figura 15 –	Auto-limpeza no campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	56
Figura 16 –	Número de alongamentos no centro+periferia do campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	57

Figura 17 – Ligação da [3H] citisina aos nAChRs durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	60
Figura 18 – Ligação do [3h]HC-3 ao transportador pré-sináptico de colina durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	62
Figura 19 – Atividade da CHAT durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.....	64
Figura 20 – A atividade da AChE durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentrações de diferentes componentes dos cigarros 2R1F e 4A1	25
Tabela 2 -	Concentrações de diferentes componentes dos cigarros 2R1F e 4A1 ...	25
Tabela 3 –	Análise estatística global das medidas comportamentais clássicas	40
Tabela 4 –	Análise estatística global das medidas comportamentais etológicas	47
Tabela 5 –	Análise estatística global do sistema colinérgico cortical	58
Tabela 6 –	Resumo dos resultados comportamentais	68
Tabela 7 –	Resumo de resultados do sistema colinérgico cortical	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PN	Dia de vida pós-natal
PN44	44° dia pós-natal
PN45	45° dia pós-natal
PN49	49° dia pós-natal
PN50	50° dia pós-natal
PN74	74° dia pós-natal
PN75	75° dia pós-natal
AChE	Acetilcolinesterase
nAChRs	Receptor nicotínico colinérgico
[3h]HC-3	Hemicolinium tritiado
cm	Centímetros
min	Minutos
ANOVA	Análise de Variância
P	Valor de prova
AltaNic	Cigarros com alta concentração de nicotina
BaixaNic	Cigarros com baixa concentração de nicotina
CT	Controle
Mg/cigt	Miligramas por cigarro
Hrs	Horas
S	Segundos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVOS	23
1.1	Objetivos gerais	23
1.2	Específico	23
2	MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1	Animais	24
2.2	Formação dos grupos Experimentais	24
2.3	Exposição à Fumaça de Cigarro	25
2.4	Máquina de queima de cigarros.	26
2.5	Cotina	28
2.6	Testes comportamentais	29
2.6.1	<u>Labirinto em cruz elevado (LCE)</u>	29
2.6.2	<u>Teste do campo vazado</u>	31
2.7	Análise do Sistema Colinérgico	32
2.7.1	<u>Medidas bioquímicas de avaliação do sistema colinérgico</u>	33
2.8	Linha Temporal	35
2.9	Análise estatística	36
3	RESULTADOS	38
3.1	Níveis de cotina sérica	38
3.2	Efeitos na massa corporal	38
3.3	Medidas comportamentais clássicas	40
3.4	Efeitos no labirinto em cruz elevado	41
3.5	Efeitos no campo vazado	44
3.6	Medidas Etológicas	47
3.7	Efeitos no Labirinto em cruz elevado	48
3.8	Efeitos no Campo vazado	54
3.9	Medidas Colinérgicas	58
3.10	Efeitos na ligação da citisina aos nAChRs	59
3.11	Efeitos no transportador pré-sináptico de colina ([³H]HC-3 ligação)	61
3.12	Efeitos na atividade da CHAT	63

3.13	Efeitos na atividade da AChE	65
4	DISCUSSÃO	66
4.1	Resumo dos Resultados	67
4.2	Efeitos sobre a massa corporal	71
4.3	Níveis séricos de cotinina	71
4.4	Testes Comportamentais	72
4.4.1	<u>Discussão Comportamental</u>	72
4.4.2	<u>Labirinto em Cruz Elevado</u>	73
4.4.3	<u>Campo Vazado</u>	74
4.4.4	<u>Efeitos sobre as variáveis etológicas</u>	77
4.5	Medidas Colinérgicas	78
4.5.1	<u>Efeitos na ligação da citisina aos nAChRs</u>	78
4.5.2	<u>Efeitos na ligação do [3H]HC-3 ao transportador pré-sináptico de colina</u>	80
4.5.3	<u>Efeitos na atividade da CHAT</u>	81
4.5.4	<u>Efeitos na atividade da AChE</u>	82
	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO

A adolescência é uma fase de expansão de fronteiras e teste de limites que inclui comportamentos impulsivos e arriscados. O comportamento de risco, comum em mamíferos, é uma parte normal do desenvolvimento, necessária para o processo de evolução de dependência para a independência (Spear, 2000). A adolescência é considerada um período crítico ou sensível do desenvolvimento cerebral. Surgem muitas desordens psicológicas durante este período, e várias delas exibem uma característica impulsiva (Whelan e cols., 2012). O sistema nervoso em desenvolvimento é mais vulnerável a danos que o sistema nervoso do adulto. O período de formação do cérebro é mais longo que o de outros órgãos. Seu desenvolvimento continua até a adolescência quando ainda ocorre proliferação de neurônios, apoptose e rearranjo sináptico em diversas regiões (Bayer e cols., 1982; Huttenlocher, 1990; McWilliams e Lynch, 1983; Spear, 2000; Cunningham e cols., 2002; Durston e cols., 2001; Koshibu e cols., 2004), assim, pode-se supor que o cérebro do adolescente ainda é vulnerável a efeitos deletérios da exposição a agentes externos.

O período da adolescência é verdadeiramente um período revolucionário em qualquer vida, a idade que ocorre desenvolvimento explosivo tanto emocional quanto cognitivo. Esta é uma fase quando surgem as paixões, quando há um pico na criatividade, idéias inovadas e amizades são estabelecidas. No entanto, adolescentes marcam este período com o aumento no número de suicídios, acidentes, homicídios, desordens de humor, gravidez não planejada, anorexia, bulimia, e abuso de substâncias (Resnick e cols., 1997; Ozer e cols., 2004).

Em algumas espécies é difícil caracterizar quando a transição para adolescência começa a acontecer e quando o indivíduo passa de adolescente a adulto. Na espécie humana, a adolescência compreende toda a segunda década de vida (Petersen e cols., 1996), particularmente, o período de 12 a 18 anos de idade (Spear, 2000). Alguns autores consideram ainda uma adolescência tardia, que se estende até os 25 anos de idade (Baumrind, 1987). Em roedores como ratos e camundongos, as primeiras alterações associadas à adolescência podem ocorrer já a partir do vigésimo dia de vida pós-natal (PN20) e as últimas mudanças podem ocorrer até PN55. Em camundongos, a adolescência pode ainda ser dividida em precoce (PN 24 a 35), média (PN 37 a 48) e tardia (PN 50 a 61) (Adriani e cols., 2002). Contudo, alguns autores consideram que a adolescência ocorre propriamente entre PN28 e PN42 (Spear, 2000) e que, em PN56, o animal se encontra na fase adulta jovem (Andersen, 2003; Spear, 2000). Outros grupos de pesquisa consideram o período de PN30 a PN45 (Abreu-Villaca e cols.,

2006, 2007; Oliveira-da-Silva e cols., 2010; Ribeiro-Carvalho e cols., 2009; Slotkin & Seidler, 2009).

Em alguns testes comportamentais, a performance dos adolescentes é igual a dos adultos. Entretanto, o que se observa é que para uma mesma tarefa, o cérebro adolescente age como um cérebro adulto desempenhando uma tarefa muito mais difícil, logo, eles despendem mais trabalho para atingir essa igualdade de performance (Powell, 2006).

O cérebro do adolescente, particularmente o córtex pré-frontal e áreas que atuam em mecanismos de recompensa ainda estão em desenvolvimento (Van e cols., 2010), o que leva a adolescentes apresentarem uma propensão a comportamentos de risco, incluindo o uso de cigarros, bebidas alcoólicas e uso de outras drogas (Dahl RE, 2004; Steinberg e cols., 1994). Estruturas subcorticais como o hipotálamo, mesencéfalo, núcleo accumbens, estriado dorsal e ventral e amígdala são importantes para processar emoções e impulsos no início da puberdade (Sowell e cols., 2003; Casey e cols., 2005). A maturação dessas áreas também contribui para o desenvolvimento do comportamento social e sexual e aumento dos níveis de hormônios sexuais que ocorre caracteristicamente durante a puberdade.

A iniciação do uso de substâncias durante a adolescência está direcionada, em parte, por fatores biológicos. O vício é um processo progressivo e complexo de desordem cerebral (Volkow e cols., 2009) que altera o funcionamento e as estruturas de áreas cerebrais responsáveis por prazer, tomada de decisão, autocontrole, e sobrevivência, incluindo motivação, risco e recompensa, busca do prazer, controle e inibição de impulsos, entre outros (Dackis e cols., 2005; Volkow ND, 2005).

Diversos estudos mostram que adolescentes tendem a usar mais de um tipo de droga (Elders e cols., 1994; Galduróz e cols., 2004; Lucas, 2006; Pillon e cols., 2005). Também foi demonstrado que tabaco é uma das drogas preferidas entre os adolescentes (Galduróz e cols., 2004) e que a iniciação precoce de uso de tabaco aumenta a probabilidade do uso de substâncias ilícitas (Grant e cols., 1997; Plazek e cols., 2009).

A análise de dados da *National Survey on Drug Use and Health* indica que de 9 a 10 pessoas que reúnem critérios de desordem por uso de substâncias envolvendo nicotina, álcool e outras drogas, iniciaram o uso das mesmas antes de completarem 18 anos (The National Center on Addiction and Substance Abuse, 2011). Indivíduos que iniciam o uso de alguma substância aditiva (incluindo nicotina, álcool ou outras drogas) antes dos 15 anos de idade apresentam 6,5 vezes mais chances de desenvolver desordens quando comparados a indivíduos que iniciam o uso aos 21 anos de idade ou mais (The National Center on Addiction and Substance Abuse, 2011)

De fato, o uso de tabaco por adolescentes têm fatores de risco para a iniciação, como fatores sociodemográficos (sexo, idade, classe social, etnia), familiares (relação pais-filhos, morar ou não com os pais, história social e estado civil dos pais) e comportamentais (Bobo & Husten, 2000; Fisher e cols., 2007; Little, 2000; Tavares e cols., 2004), além da pressão exercida pelo grupo social no qual o jovem está inserido contribuir significativamente para que o adolescente se torne um usuário de cigarro (Bobo e Husten, 2000; Little, 2000; Mallett e cols., 2006). Contudo, estudos indicam que fatores fisiológicos também são determinantes do uso e abuso de tabaco por adolescentes (Grucza e Bierut, 2006).

Em paralelo, estudos em camundongos adolescentes expostos a cigarros com diferentes níveis de nicotina, mostram que existem diferenças funcionais na sensibilidade entre cepas de camundongos *inbred* e *outbred* sugerindo que há influências genéticas no uso e abuso de drogas (Overstreet, 1995).

A maioria dos fumantes inicia o hábito de fumar durante a adolescência, de modo que a dependência ao tabaco é frequentemente considerada uma doença pediátrica. De fato, no mundo, entre 82.000 e 99.000 dos jovens começam a fumar diariamente, e 4 milhões de mortes por ano são atribuídas ao fumo (Prokhorov e cols., 2006).

O fumo de cigarros está associado a uma vasta gama de efeitos adversos à saúde, incluindo alguns tipos de câncer, disfunção cardiovascular, doença dental, alteração respiratória, problemas reprodutivos, disfunção de ereção, úlcera péptica e doenças ósseas (United States Department of Health and Human Services, 2004).

Estudos em humanos com fumaça de cigarros, apresentam um achado comum que é a diminuição global da atividade cerebral (Yamamoto e cols., 2003) observado por imagens de tomografia computadorizada. E outros demonstram diminuição do fluxo sanguíneo cerebral observado com exame de Doppler (Kodaira e cols., 1993; Terborg e cols., 2002).

Fumantes são mais propensos a apresentar critério de diagnóstico para doença mental, como distúrbios de humor, ansiedade e psicoses quando comparados a não-fumantes (Breslau, 1995; Degenhardt, 2001). Nos Estados Unidos, fumantes adultos apresentam o dobro de diagnóstico de depressão (43%) quando comparados a não-fumantes (22%) (Pratt & Brody, 2010). Os mecanismos que envolvem o vínculo de condição de saúde mental e fumantes são complexos e se diferenciam para cada tipo de distúrbio. No entanto, muitos dos distúrbios psiquiátricos são intensificados durante a intervenção para cessação do ato de fumar (Peterson e cols., 2011).

Estudos em humanos com fumaça de cigarros, apresentam um achado comum que é a diminuição global da atividade cerebral (Yamamoto e cols., 2003) observado por imagens de

tomografia computadorizada. E outros demonstram diminuição do fluxo sanguíneo cerebral observado com exame de Doppler (Kodaira e cols., 1993; Terborg e cols., 2002).

O número de fumantes permanece em queda no Brasil. É o que revela a pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel 2011), realizado pelo Ministério da Saúde. Segundo a pesquisa, de 2006 a 2011, o percentual de fumantes passou de 16,2% para 14,8%. A incidência de homens fumantes no período 2006-2011 diminuiu a uma taxa média de 0,6 % ao ano, segundo o Vigitel 2011. A frequência é menos da metade do índice de 1989, quando a Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (PNSN), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), apontou 34,8% de fumantes na população (Ministério da Saúde de São Paulo). De acordo com o Relatório Mundial da Saúde (OMS, 2002b), no Brasil, adultos com baixa ou sem escolaridade têm cinco vezes mais chances de fumar que aqueles que atingiram o Ensino Médio.

No Brasil, na região Sul tinha, em 2008, o maior percentual de fumantes de tabaco (19,0%), sendo os menores percentuais verificados no Centro-Oeste (16,6%) e Sudeste (16,7%). Entre os homens, os maiores percentuais de fumantes estavam no Nordeste (22,9% ou 4,2 milhões de pessoas) e no Sul (22,5% ou 2,3 milhões); já entre as mulheres, eles foram verificados no Sul (15,9%) e Sudeste (13,3%) (Petab, 2008).

Embora a prevalência do consumo de tabaco venha diminuindo em países desenvolvidos, o mesmo não acontece em boa parte dos países em desenvolvimento, nos quais vivem 80% dos fumantes (Rosemberg e cols., 2004). O marketing agressivo e as regulamentações permissivas, com tarifas mais leves, favorecem o incremento das indústrias de tabaco em países mais pobres (Bartecchi e cols., 1995).

Os cigarros de tabaco contêm cerca de 4.500 substâncias químicas – algumas cancerígenas e outras tóxicas (Rosemberg e cols., 2004). Desta forma, o cigarro de tabaco predispõe o fumante a um grande número de doenças. Dentre os componentes da fumaça de cigarro, a nicotina, um alcalóide natural presente nas folhas de tabaco, é um dos principais componentes ativos da fumaça do cigarro.

Durante o uso de cigarros foi observado que a nicotina é rapidamente distribuída para o cérebro e pulmões (Benowitz e cols., 1988; Rucktooa e cols., 2009). No cérebro, a mesma apresenta alta afinidade com os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), resultando em rápida liberação de alguns neurotransmissores, como a dopamina no sistema mesolímbico (Olinicy e cols., 1997; Pomerleau e cols., 1995).

A inalação é a via mais rápida de absorção da nicotina. Variações na absorção são encontradas dependendo da via de administração da droga. Adesivos transdérmicos ou pastilha mastigável é sempre inferior a 50% em comparação ao cigarro (Lebargy, 2003). Um estudo com fumantes adultos cujo consumo médio é de 18 cigarros/dia, mostra que o pico plasmático da nicotina é atingido 5 minutos após tragar a fumaça do cigarro, seguido de um rápido declínio em apenas 12 minutos, enquanto que, após a administração via oral, tipo goma de mascar, a nicotina atinge seu pico plasmático em cerca de 30 minutos e decresce lentamente nas próximas horas (Benowitz e cols., 1988).

A absorção da nicotina é pH-dependente (Svensson, 1987), a fumaça do cigarro disponibiliza a nicotina em sua forma ácida, o que promove uma maior absorção nos alvéolos pulmonares enquanto a nicotina via oral se encontra em sua forma alcalina e é rapidamente absorvida pela mucosa oral (Galvão & Moreau, 2003; Tutka e cols., 2005).

A nicotina é considerada uma das substâncias psicoativas mais importantes na fumaça de cigarro e responsável pela adição ao tabaco (Para revisão: Fowler, Arends, e Kenny, 2008). A nicotina é considerada o principal responsável pelos efeitos comportamentais da exposição a fumaça de cigarro (Jacobsen e cols., 2005, 2007; Levin e cols., 2006; McGehee, 2007). Este alcalóide atua em grande número de processos fisiológicos e patológicos como neurotransmissão da dor, controle do movimento, processos cognitivos, respostas emocionais e abuso de drogas associadas à exposição ao tabaco (Buisson & Bertrand, 2002; File e cols., 2002; Jain, 2004; Katner e cols., 2004).

Como consequência, durante as últimas décadas, a indústria do tabaco tem direcionado esforços para reduzir a nicotina contida nos cigarros, mas, a despeito disso, a nicotina ainda esta presente, ainda que em níveis menores (Dunsby e Bero, 2004; Walker e cols., 2009).

Está estabelecido que a nicotina é neuroteratogênica, afetando o cérebro pela interferência em mecanismos de mitose e diferenciação, causando alterações na axonogênese e sinaptogênese e conseqüentemente comprometendo a atividade sináptica. A ligação da nicotina a receptores pré-sinápticos indiretamente afeta uma grande variedade de sistemas de neurotransmissores; sendo que, como um análogo da acetilcolina, os receptores de acetilcolina nicotínicos inotrópicos (nAChRs) são os mediadores celulares primários destes efeitos. Porém, há estudos que sugerem que existe a possibilidade de outros componentes além da nicotina estarem participando nos efeitos colinérgicos existentes resultantes da exposição a fumaça de cigarro (Slotkin, 2008).

A prevalência de dependência à nicotina é altamente frequente entre os indivíduos com algum transtorno de ansiedade, com dados indicando 31,5% para fobia social e 54,6% para

desordens de ansiedade generalizada em pessoas fumantes (Laviolette & van der Kooy, 2004).

Um estudo transversal em humanos indicou que fumantes quando comparados a não-fumantes apresentam mais sintomas associados ao pânico (McClave e cols., 2010; Zvolensky e cols., 2002). A associação pode ser por fatores como a predisposição genética ou, por exemplo, após exposição a experimentação de drogas (Comings e cols., 1996; Gilbert, 1995).

O consumo de tabaco aumenta o risco de desenvolvimento de ansiedade. Fumantes apresentam maiores taxas de ansiedade quando comparados a não-fumantes, *Odds Ratio* (OR) entre 1,5 e 4,2. No entanto, é importante considerar a co-ocorrência de tabagismo com o consumo de álcool e outras substâncias, o que pode artificialmente inflacionar as estimativas de prevalência de tabagismo em indivíduos com perturbações de ansiedade (Morissette e cols., 2007).

Algumas evidências dão suporte a idéia de que a ansiedade é um sintoma que aumenta a probabilidade de se iniciar o hábito de fumar (Morissette et al., 2007). Estudos com fumantes adultos têm mostrado que o tabaco pode reduzir a ansiedade, sendo que este efeito é normalmente atribuído à nicotina presente nos cigarros (Kassel & Unrod, 2000).

Em humanos, estudos epidemiológicos mostram que adolescentes também apresentam maiores níveis de ansiedade durante a abstinência (Horn e cols. 2004). Adicionalmente, adolescentes que apresentaram resposta ansiolítica quando fumaram seu primeiro cigarro apresentam maior probabilidade de se tornarem dependentes e de relatarem que estresse causa urgência em fumar e recaídas durante a abstinência (DiFranza e cols., 2004).

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste comportamental que foi criado há cinco décadas (Montgomery, 1955), foi primeiro descrito por Handley and Mithani (1984) como um método usado para investigar os comportamentos associados a ansiedade e para estudar o envolvimento de neurotransmissores na ansiedade (Dorow e cols., 1983; Pellow & File, 1986; Moster, 1989; Cruz e cols., 1994; Rodgers & Cole, 1994; Anseloni & Brandão, 1997; Anseloni e cols., 1995). O método foi considerado ser confiável e validado para medidas de ansiedade, com base em extensivas investigações analisando muitos aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (Pellow e cols., 1985; Cruz e cols., 1994; Rodgers & Cole, 1994; Anseloni & Brandão, 1997).

Estudos sugerem que efeitos da fumaça de cigarro sobre os níveis de ansiedade são devidos a nicotina. Estudos mostram que a nicotina pode afetar os níveis de ansiedade de diferentes formas (Picciotto e cols., 2002). Em roedores, tem se mostrado que a nicotina pode ser ansiogênica, ansiolítica ou não causar alterações nos níveis de ansiedade (Broni e cols.,

1993; Irvine e cols., 1999, 2001; Ouagazzal e cols., 1999). Estas diferenças dependem da dose, tempo entre as injeções e teste, a forma de administração e do teste comportamental utilizado (Salas e cols., 2003). Estudos em animais com nicotina administrada de forma aguda em animais inexperientes têm sido um pouco inconsistentes nos resultados encontrados. Pesquisas realizando a administração de nicotina em doses baixas usando o teste de labirinto em cruz elevado ou teste de interação social, têm apresentado nos resultados propriedades ansiolíticas (Brioni e cols., 1993; File e cols., 1998; Irvine e cols., 1999; Cheeta e cols., 2001), enquanto altas doses têm demonstrado a produção de efeitos ansiogênicos (File e cols., 1998; Ouagazzal e cols., 1999; Cheeta e cols., 2001; Balerio e cols., 2006). Outros têm descrito efeitos ansiogênicos da nicotina em doses baixas (Biala & Budzynska, 2006; Biala & Kruk, 2008).

Um trabalho do nosso laboratório de 2008 comparou camundongos expostos a nicotina, os quais bebiam uma solução de nicotina oferecida *ad libitum* controle, que bebiam somente água durante 15 dias do período da adolescência (Período de Exposição). Após este período, os animais eram submetidos a uma período de 3 dias de abstinência, seguido por um período de 7 dias de re-exposição. Ao final de cada etapa foram realizados testes comportamentais em um aparelho classicamente utilizado para avaliar alterações nos níveis de ansiedade e possíveis diferenças comportamentais, no qual indicou que durante o período de exposição os animais apresentaram redução do comportamento associado à ansiedade, contudo, durante o período de abstinência da nicotina, os animais se tornaram mais ansiosos. Durante o período de re-exposição, os animais previamente expostos a nicotina que exibiram os mais altos níveis de ansiedade durante o período de abstinência apresentaram uma significativa redução do consumo de nicotina quando comparados com aqueles camundongos que também previamente receberam nicotina mas que apresentaram menores níveis de ansiedade (Manhães e cols., 2008). Estes resultados indicam que a influência da nicotina nos níveis de ansiedade é complexa e pode estar relacionada com o aumento de liberação de diferentes neurotransmissores em uma variedade de estruturas cerebrais.

A busca pela novidade, representada em animais experimentais pelo aumento da exploração de objetos ou estímulos desconhecidos, é um dos comportamentos mais estudados como fator predisponente para o uso de drogas. Diversos trabalhos têm sugerido que a busca pela novidade em roedores pode ser utilizada para avaliar alguns aspectos da “busca por sensações estimulantes” em humanos (Dellu-Hagerdon, 2006; Kliethermes e cols., 2007). Modelos experimentais em animais têm mostrado que a busca por drogas é mais freqüente na presença deste comportamento (Piazza e cols., 1989; Wills e cols., 1994; Bardo e cols., 1996; Bardo &

Dwoskin, 2004; Abreu-Villaça e cols., 2006; Pelloux e cols., 2006). De acordo com estes achados, a busca pela novidade, assim como o uso de drogas psicoestimulantes, compartilham um substrato neurobiológico similar, que é a ativação de estruturas e vias mesolímbicas. A exploração a um novo ambiente tem sido associada, em ratos, com o aumento dos níveis de dopamina no núcleo accumbens, o qual é freqüentemente associado com o fenômeno de recompensa (Hoebel e cols., 1983; Robbins & Everitt, 1996; Wise, 1996; Ikemoto & Wise, 2004). Diversos estudos em animais avaliam este comportamento submetendo-os ao teste de campo vazado (CV) (Escorihuela e cols., 1999; Vaglenova e cols., 2004). O CV foi padronizado por Boissier e Simon (1962) como medida geral da atividade motora e de exploração (File & Wardill, 1975; Durcan & Lister, 1989; File, 2001). O número de orifícios explorados no CV é utilizado como medida da atividade exploratória (Escorihuela e cols., 1999; Abreu-Villaça e cols., 2006; Fraga-Marques e cols., 2009).

Os efeitos da nicotina são em parte mediados via nAChRs, ativando os canais iônicos pós-sinápticos, que medeiam uma rápida neurotransmissão sináptica (Corringer e cols., 2000) e pré-sinápticos, que participam da modulação da liberação de neurotransmissores em diferentes tipos de neurônios (Para revisão: Abreu-Villaça, Filgueiras & Manhães, 2010). Os nAChRs são encontrados em músculos e neurônios e são compostos das subunidades α ($\alpha 2 - \alpha 10$) e β ($\beta 2 - \beta 4$). A diversidade dos subtipos de nAChR, sua localização (pré ou pós sináptica) e sua distribuição cerebral contribuem para a variedade de mecanismos que estes receptores participam no sistema nervoso central. (Elgoyhen e cols., 1994, 2001; Lindstrom e cols., 1996; McGehee & Role, 1995; Sargent, 1993; Tassonyi e cols., 2002) . Os receptores nicotínicos $\alpha 4$ e $\beta 2$ (denotados como $\alpha 4\beta 2$ nAChRs) são os mais frequentemente encontrados no sistema nervoso central (SNC) (Flores e cols., 1992) e são considerados um dos principais subtipos envolvidos na regulação das ações de adição da nicotina (Buisson & Bertrand, 2002).

Estudos anteriores em animais experimentais em sistemas colinérgicos indicam que a exposição à nicotina durante a adolescência causa suprarregulação de nAChRs e hipoatividade colinérgica e catecolaminérgica do mesencéfalo, uma região que tem sido associada a mecanismos de recompensa e dependência; assim como no córtex e no hipocampo, regiões associadas a funções cognitivas (Trauth e cols. 2000; 2001; Abreu-Villaça e cols., 2003; 2003a; 2004b, Ribeiro Carvalho e cols., 2008)

Existem evidências que indicam características únicas da resposta do cérebro do adolescente à nicotina, como suprarregulação persistente dos nAChRs quando comparados a adultos (para revisão: Slotkin, 2008). De fato, foi demonstrado que exposições por curtos períodos de tempo (2 dias) e com doses que produzem níveis plasmáticos de nicotina

correspondentes a fumar 2 cigarros, já causam suprarregulação dos AChRs em ratos adolescentes (Abreu-Villaça e cols., 2003a). Acredita-se que a suprarregulação constitui uma resposta celular à dessensibilização (Fenster e cols., 1999). Quanto aos efeitos da fumaça de cigarro, foi demonstrado em humanos que a exposição causa suprarregulação de receptores colinérgicos, de forma semelhante ao que ocorre em roedores expostos a nicotina (Dani & Bertrand, 2007; Falk, 2005).

Considerando que o cigarro contém cerca de 4500 substâncias, pode-se levantar a hipótese que outros componentes além da nicotina tenham papel relevante nos efeitos do tabaco no sistema nervoso central. Infelizmente, o grande número de substâncias presentes no cigarro e a falta de dados sobre suas propriedades psicoativas têm vindo a adiar o progresso nesta área.

Quanto a estudos que investigaram o papel de componentes da fumaça de cigarro, foi demonstrado que exposição a Anabaseína, um alcaloide, causou um aumento nos níveis intracelulares de ACh no córtex (Summers e cols., 1997). O Acetaldeído, o metabólito primário do etanol, causou uma diminuição na captação de ACh no córtex (Jamal e cols., 2005). A fumaça de cigarro contém altas concentrações de β -carbolina, outro alcaloide também conhecido como *norharman* e *harman*, que inibe a monoamina oxidase (MAO). A *norharman* e *harman* tem efeitos antidepressivos em roedores (Aricioglu & Altunbas, 2003; Farzin & Mansouri, 2006) e estudos clínicos indicam que drogas que inibem a MAO-A, tem efeitos antidepressivos em humanos (Blier & de Montigny, 1994).

Ainda há poucos estudos que descrevem os efeitos da fumaça de cigarro em camundongos e estes visam obter informações sobre os efeitos aditivos e comportamentais, para correlacionar aos efeitos encontrados em humanos. Um grupo que trabalha com fumaça de cigarros em animais é do Slotkin nos USA, porém, na maioria destes estudos, a exposição a fumaça de cigarro ocorreu durante o período gestacional e/ou lactação (Chistyakov e cols., 2010; Bush e cols., 2000; Navarro e cols., 1989; Tizabi e cols., 1997).

Assim, visando nos aproximarmos do padrão de exposição de humanos fumantes, nos últimos anos, nosso laboratório de Neurofisiologia da UERJ iniciou estudos visando investigar os efeitos da exposição de camundongos adolescentes a fumaça de cigarros. Um estudo recente realizado em nosso laboratório teve como objetivo investigar os efeitos da exposição a fumaça de cigarro quando combinada ou não com a exposição ao etanol nos níveis de ansiedade. Ao final do período de exposição foram observados efeitos significativos em fêmeas nos comportamentos associados à ansiedade, provocados pela exposição à fumaça e a fumaça+etanol quando comparado ao grupo controle, indicando assim

uma resposta ansiolítica. Alguns dias após o término da exposição, as fêmeas previamente expostas a fumaça de cigarro apresentaram uma resposta ansiolítica, contudo, os níveis de ansiedade voltaram ao normal com o passar dos dias de abstinência. Interessantemente, um mês após o término da exposição, observamos que, apesar dos animais expostos a fumaça ou etanol não apresentarem alterações, o grupo fumaça+etanol se mostrou ansiogênico, sugerindo que a exposição combinada a estas drogas durante a adolescência tem efeitos deletérios evidentes com a persistência da abstinência (Abreu-Villaça e cols., 2013).

Durante as últimas décadas, a indústria do tabaco tem direcionado esforços para reduzir o teor de nicotina nos cigarros, mas, apesar disso, a nicotina ainda está presente, mesmo que em níveis mais baixos, nos cigarros comercializados (Dunsby & Bero, 2004; Walker, Bullen, & McRobbie, 2009). Apesar destes esforços, o impacto do teor de nicotina estar sendo reduzido ainda é controverso (Dunsby & Bero) e, de particular relevância para nosso estudo, se o sistema colinérgico é efetivamente afetado pela redução dos níveis de nicotina em cigarros permanece pouco conhecido. Neste sentido, em outro trabalho do nosso grupo, expusemos camundongos adolescentes a cigarros contendo alto teor de nicotina (0,73 mg/cigarros), baixo teor de nicotina (0,14 mg/cigarros) ou a ar corrente. Verificamos que, ao final da exposição, o córtex cerebral de ambos os grupos expostos a fumaça de cigarros apresentou aumento na captação de colina quando comparado ao grupo controle exposto a ar, enquanto que, no hipocampo, foi observado aumento na captação de colina somente no grupo exposto a fumaça de cigarro com alto teor de nicotina. Estes resultados sugerem que componentes da fumaça de cigarro que não a nicotina afetam o sistema colinérgico central e que os componentes da fumaça de cigarro tem papéis diferentes em modular a atividade deste sistema neurotransmissor, dependendo da região cerebral analisada (Abreu-Villaça e cols., 2010).

Apesar do grande número de estudos dos efeitos da nicotina no sistema colinérgico, há poucos estudos em modelos animais dos efeitos da fumaça de cigarro sobre o comportamento e a neurotoxicidade. Adicionalmente, temos pouco conhecimento de estudos sobre a base neuroquímica e comportamental das alterações promovidas pela exposição da fumaça de cigarro durante o período da adolescência. Considerando que a nicotina é um agonista dos nAChRs e que tem sido demonstrado que a nicotina atua em receptores ionotrópicos, incluindo os colinérgicos, o estudo do sistema colinérgico possui grande relevância no entendimento das bases neuroquímicas envolvidas nos processos de uso e abuso e dependência. Entre os fatores que tem papel importante no uso de cigarro por adolescentes, o

estudo da ansiedade e da busca por novidade pode fornecer contribuições importantes (DiFranza e col, 2005; Laviola e col, 2003).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivos gerais

Investigar os efeitos de curto e longo prazo da exposição de camundongos adolescentes à fumaça de cigarros contendo diferentes níveis de nicotina no sistema colinérgico central e comportamentos associados.

1.2 Objetivos específicos

- a) Quantificar cotinina plasmática (principal metabólito da nicotina) em animais adolescentes expostos à fumaça de cigarro contendo alto ou baixo teor de nicotina.
- b) Investigar se há diferenças marcantes na performance comportamental (ansiedade, busca por novidade e atividade locomotora) associadas à exposição à fumaça de cigarro contendo alto ou baixo teor de nicotina durante a adolescência.
- c) Uma vez que nAChRs são alvos primários da nicotina, verificaremos os efeitos da fumaça do cigarro contendo alto ou baixo teor de nicotina no sistema colinérgico central durante a adolescência.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Para este estudo foram utilizados camundongos Suíços. Os animais foram criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro num ciclo diário de 12 horas claro/escuro (escuro a partir de 13 h), temperatura controlada e mantida em torno de 21° C, com livre acesso à água e comida. Os experimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA/014/2011) e estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de cuidados e uso de animais de laboratório adotado e promulgado pelo Instituto Nacional de Saúde.

2.2 Formação dos grupos experimentais

Os animais progenitores foram organizados em gaiolas com um macho e múltiplas (de duas a quatro) fêmeas. Assim que a gravidez foi verificada, a grávida era individualizada e acompanhada diariamente para determinação do dia do nascimento. A data de nascimento foi considerada dia pós-natal um (PN1). Para este estudo foram utilizadas apenas ninhadas com 8 a 12 animais. Ninhadas com 9 a 12 animais que se encaixam nesse critério foram reduzidas para 8 animais em PN2. Ao completarem 21 dias de vida pós-natal (PN21), os animais foram desmamados e separados por sexo; os irmãos do mesmo sexo permanecem juntos até PN30, quando se dá início a exposição à fumaça de cigarro contendo diferentes concentrações de nicotina. Com duração de 15 dias, período que abrange a adolescência destes animais, a exposição é encerrada em PN45.

2.3 Exposição à fumaça de cigarro

Animais foram expostos a fumaça gerada a partir de um dos dois tipos de cigarros para pesquisa descritos a seguir: cigarros 2R1F contendo 1,7mg de nicotina por cigarro (Universidade de Kentucky, Grupo AltaNic) ou cigarros 4A1 contendo 0,14mg de nicotina por cigarro (Universidade de Kentucky, Grupo BaixaNic). Outras características conhecidas destes cigarros são descritas na tabela 1 e 2. Foi realizada a exposição de todo o corpo do camundongo à fumaça de cigarro no período de 8hr/dia, de 9 a.m a 5 p.m, 7 dias/semana (Abreu-Villaça et al., 2010; 2013; Slotkin et al., 2001) em uma câmara que recebeu fumaça a partir de uma máquina automática que gerava fumaça de cigarro (Teague Enterprises, Davis, CA, USA). Animais controle foram expostos a ar corrente em uma câmara idêntica aquela usada para expor os animais a fumaça (Grupo CT).

Tabela 1 - Concentrações de diferentes componentes dos cigarros 2R1F e 4A1

Análise da Fumaça			
	PT MG/CIG	Alcatrão MG/CIG	NICOTINA MG/CIG
	30 mm ¹	30 mm ¹	30 mm ¹
2R1F	28,6	23,4	1,74
4A1	29,7	26,8	0,14

¹Comprimento da ponta de cigarro remanescente após fumar
 Abreviações:
 PT – Partículas Totais em Suspensão

Fonte: A autora, 2014

Tabela 2 - Concentrações de diferentes componentes dos cigarros 2R1F e 4A1

Análise da Fumaça			
	AGUA MG/CIG	CO MG/CIG	NOX MG/CIG
	30 mm ¹	30 mm ¹	30 mm ¹
2R1F	3,52	22,0	0,33
4A1	2,71	17,2	0,35

¹Comprimento da ponta de cigarro remanescente após fumar
 Abreviações:
 CO – Monóxido de carbono
 NOX – Óxidos de Nitrogênio

Fonte: A autora, 2014

Desta forma, um estudo completo do impacto da exposição à fumaça de cigarros com diferentes concentrações de nicotina durante a adolescência requereu 3 grupos experimentais:

Grupo exposto à fumaça de cigarros de baixa nicotina (Baixa Nic)

Animais foram expostos a fumaça de cigarros para pesquisa (tipo 4A1) com baixa concentração de nicotina (0,14mg/cigarro), durante 8 horas por dia.

Grupo exposto à fumaça de cigarros de alta nicotina (Alta Nic)

Animais expostos à fumaça de cigarros para pesquisa (tipo 2R1F) com alta concentração de nicotina (1,74mg) durante 8 horas por dia.

Grupo controle (CT)

Os animais foram ambientados na mesma sala, em uma câmara separada com ventilação própria, durante 8 horas por dia.

2.4 Máquina de queima de cigarros

Dada a complexidade do aparelho, este pode ser melhor explicado se dividido em partes.

A porção superior (Figura 1-a) tem como função principal a queima de cigarros e então distribuição da fumaça gerada para as câmaras abaixo. Inicialmente, os cigarros posicionados manualmente descem por uma esteira (b), onde ao final se localiza uma porção metálica a partir da qual cada cigarro é empurrado por um pistão a cada oito minutos e quarenta segundos. Após o cigarro estar posicionado adjacente a um disco (c) onde ficará ao longo do tempo em que será queimado, esse disco gira de modo a deixar o cigarro posicionado a 90 graus do eixo vertical. Ao lado oposto há uma resistência metálica (d), pela qual passa uma corrente elétrica no momento em que o cigarro fica na posição correspondente à da própria resistência. A corrente então faz a resistência se aquecer, gerando calor suficiente para acender o cigarro. O disco que prende o cigarro então gira 360 graus após alguns segundos, em um momento em que a resistência se aquece de novo, para garantir que o cigarro seja aceso. O disco então gira novamente, 90 graus, fazendo que com o cigarro saia da posição paralela à resistência e se aloque em uma posição de repouso, onde fica até o final

de sua queima. Durante estes 8 minutos e quarenta segundos, a fumaça é gerada de 2 formas: 1º pela queima passiva contínua do cigarro e 2º por sua queima ativa. Para que ocorra a queima ativa, a cada minuto, uma pequena bomba de sucção simula uma tragada do cigarro (35ml por 2 segundos), de forma que cada cigarro sofre este processo nove vezes. Ao final destes ciclos, o disco gira mais uma vez, até a posição final, onde um pistão (e) ejetta o cigarro e então o ciclo recomeça.

A fumaça de cigarro gerada pela queima passiva e ativa do cigarro é sugada de forma contínua para uma câmara de mistura (f). Assim, utilizamos uma mistura de 89% de fumaça *sidestream* (fumaça liberada pela extremidade do cigarro durante a queima) e 11% de fumaça *mainstream* (fumaça gerada pela simulação da inalação do cigarro), de forma a simular o tabagismo ativo (Abreu-Villaça e cols., 2010; 2013; Slotkin e cols., 2001). Esta mistura é sugada para as câmaras onde os animais experimentais permanecem durante o período de exposição. A porção inferior da máquina de queima de cigarros é constituída de duas câmaras, cada uma dividida em uma porção superior e uma porção inferior. Essas câmaras têm como função a exposição dos animais experimentais à fumaça de cigarros, oriunda da porção superior do aparelho. A fumaça então vem da porção superior a partir de tubos, passa às câmaras de exposição e é continuamente eliminada para o exterior do prédio também por um sistema de tubos. Todo o fluxo da fumaça desde seu local de geração até o meio externo é determinado por um exaustor que funciona de forma contínua durante o período de exposição. Desta forma, a fumaça à qual os animais são expostos é sempre renovada por esse sistema de exaustão. A pressão interna na câmara, assim como o fluxo, é regulada por uma válvula na porção anterior do aparelho, que é associada à um barômetro, cujo valor é constantemente mantido em 0,4 polegadas de coluna d'água. As câmaras são vedadas com portas de plástico, e as suas entradas são vedadas com uma borracha, de modo a impedir a entrada ou saída de ar de fora do sistema.

Figura 1 - Foto da máquina de queima de cigarro



Legenda: a) Porção superior, b) Esteira, c) Disco, d) Resistência Metálica, e) Pistão, f) Câmara de Mistura

Fonte: A autora, 2014.

2.5 Cotinina

Para análise dos níveis de cotinina sérica, após o período e exposição, em PN45, um grupo separado de animais (4 animais por grupo experimental) foram decapitados para a coleta de sangue. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a $3.000 \times g$ a $4^\circ C$, e o soro foi armazenado a $-20^\circ C$. Os níveis séricos foram determinados utilizando um kit de ELISA para

cotina em soro(OraSure Technologies - Bethlehem, PA), em conformidade com as recomendações do fabricante.

2.6 Testes comportamentais

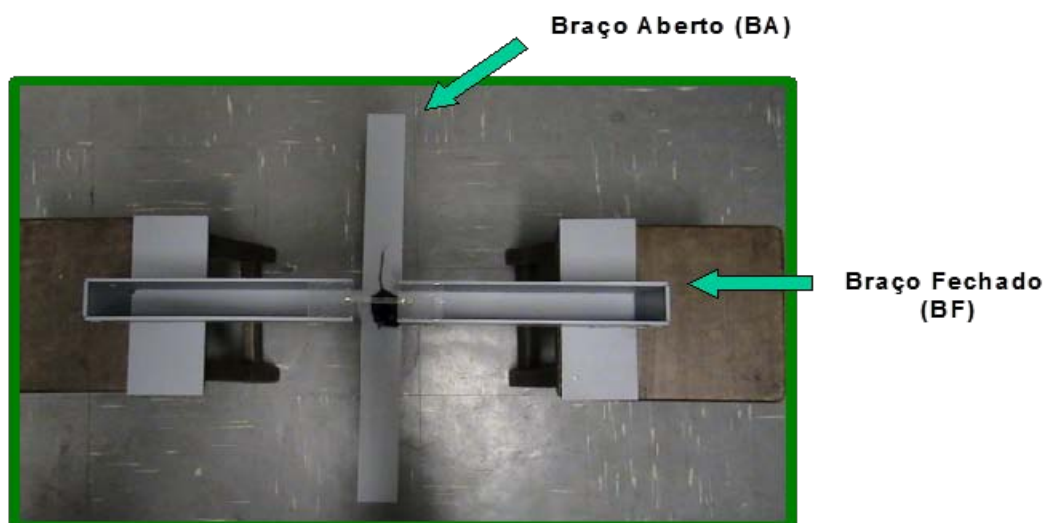
Cada animal foi submetido ao teste de *Labirinto em cruz elevado* e do *campo vazado* durante o penúltimo e último dia de exposição (PN44/45), após curto (PN49/50) e longo período de retirada (PN74/75).

2.6.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste de labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos mais populares testes em uso atualmente para se quantificar os níveis de ansiedade em animais experimentais (Carobrez & Bertoglio, 2005). O LCE foi validado para uso em espécies como ratos (Pellow e cols., 1985) e camundongos (Lister, 1987). As expressões comportamentais observadas no teste LCE representam uma combinação de comportamentos exploratórios e de esquiva, assim como de atividade geral (Carobrez & Bertoglio, 2005).

Os testes foram realizados em três idades, PN44, PN49, PN74. O LCE é um aparelho de acrílico pintado de cinza. O equipamento tem formato em cruz e consiste em 2 braços abertos (sem paredes, 28.5 x 5 cm) e dois braços fechados (com paredes 28.5 x 5 x 14 cm) perpendiculares entre si e elevados 50 cm acima do chão.

Figura 2 - Foto em vista superior do labirinto em cruz elevado



Legenda: Braço aberto (BA); Braço fechado (BF)

Fonte: A autora, 2014.

Antes do início de cada teste, as gaiolas dos animais eram transportadas para a sala de teste onde os animais foram ambientados por 30 minutos. Os camundongos foram colocados individualmente no centro do equipamento, e foi permitido que explorassem o labirinto por 10 minutos. Os testes foram realizados entre 10:00 e 13:00 horas. Após o término de cada teste, o labirinto foi limpo com um pano umedecido com água com o intuito de eliminar as excretas e minimizar odores que podem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados.

Os testes foram realizados na fase clara, numa sala com proteção acústica e gravados por uma câmera de vídeo digital posicionada a 1m acima do labirinto para análise posterior, sendo o percentual de tempo passado nos braços abertos ($\% \text{ Tempo BA}$: o tempo de permanência nos braços abertos dividido pelo tempo permanência nos braços abertos + fechados) e o percentual de entradas nos braços abertos ($\% \text{ Entradas BA}$: o número de entradas nos braços abertos dividido pelo número de entradas nos braços abertos + fechados), quantificados e usados como medidas de ansiedade (Ferandes & File, 1996; Hogg, 1996; Rodgers & Dalvi, 1997). Considerando que a atividade locomotora pode ser afetada pelos efeitos de estimulantes ou depressores da nicotina, o que pode confundir a interpretação dos resultados, a atividade foi avaliada pela quantificação do número de entradas nos braços fechados (*Entradas BF*). Portanto, a medida de Entradas BF foi usada como uma medida independente de atividade. Em adição, o percentual de tempo gasto no centro do labirinto (*Tempo Cen*: o tempo gasto no centro) foi usado como uma medida independente de tomada

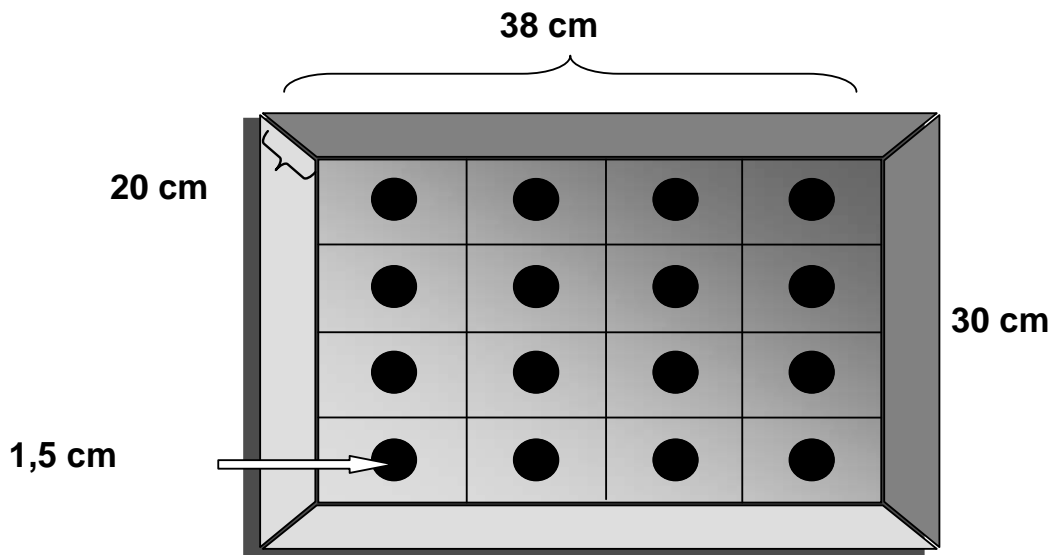
de decisão (Rodgers & Dalvi, 1997; Rodgers e cols., 1997). A postura de alongamento do corpo do animal com as quatro patas no chão nos braços abertos (*Alongamentos*) foi usado como medida de avaliação de risco (Abreu-Villaça e cols., 2006; Carola e cols., 2002). Atividade vertical e auto-limpeza também foram quantificados.

2.6.2 Teste do campo vazado

O teste do campo vazado (CV) foi utilizado para avaliar os níveis de busca por novos estímulos (“busca por novidades”) (FILE, 2001). O aparelho consiste em uma caixa retangular branca de polipropileno (30cm x 38 cm x 17cm), cujo chão é dividido em 16 retângulos (7.5 cm x 9.5 cm), sendo 12 periféricos e 4 centrais, e no centro de cada um deles há um buraco de 1,5 cm de diâmetro (Fig.2). Os testes foram realizados em três idades, PN45, PN50, PN75.

Antes do início de cada teste os animais eram levados à sala de teste para ambientação, onde permaneciam durante 30 minutos. No início do teste, cada animal foi colocado no centro da caixa, onde é permitido explorar o espaço e os orifícios livremente. Cada teste dura 10 minutos e todos os testes foram realizados em uma sala com isolamento acústico. Após o término de cada teste, o CV era limpo com água com o intuito de eliminar as excretas e minimizar odores que podem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados. Todos os testes eram gravados por uma câmera para posterior análise. Os testes foram realizados na fase clara, entre 9h e 11h.

Figura 3 - Ilustração representando o equipamento utilizado no teste do campo vazado



Fonte: A autora, 2014.

As variáveis avaliadas foram o número de vezes que os animais colocaram o focinho nos orifícios do centro e da periferia (número de orifícios explorados), foi usado como medida de busca por novidade (Abreu-Villaça e cols., 2006), quantificado utilizando-se as imagens gravadas dos testes. E foi quantificado a soma do número de retângulos explorados do centro e da periferia (Cen+Pe) para avaliação da atividade locomotora (Filgueiras et al., 2009). A postura de alongamento do corpo do animal com as quatro patas no chão em direção ao centro da arena (*Alongamento*) foi usado como medida de avaliação de risco (Fraga e cols., 2011). Atividade vertical e auto-limpeza também foram quantificados.

2.7 Análise do Sistema Colinérgico

O sistema colinérgico foi estudado no córtex cerebral e mesencéfalo, sendo estas regiões escolhidas por estarem envolvidas com os processos de vício, recaída, e também com funções cognitivas. Tais áreas foram avaliadas durante o período de exposição (PN45), no período de retirada (PN50) e durante a idade adulta (PN75). Nestes períodos de estudo, os animais sofreram eutanásia logo após o teste comportamental do campo vazado, seus cérebros

foram dissecados e as regiões cerebrais foram congeladas rapidamente por imersão em nitrogênio líquido e, então, guardadas a -45°C para posterior análise bioquímica.

2.7.1 Medidas bioquímicas de avaliação do sistema colinérgico

Todas as medidas bioquímicas que foram realizadas em animais em PN45, PN50 e PN75 foram corrigidas pela concentração de proteína total presente no tecido (no caso das enzimas ensaiadas) ou de proteínas de membrana presentes no preparado de membrana (no caso dos receptores e transportadores analisados). As proteínas foram medidas por ensaio do ácido bicinconínico (BCA).

Os tecidos foram descongelados, e homogeneizados em tampão Tris a 50mM na diluição de 40x (39 volumes de tampão por massa de tecido) utilizando um homogeneizador tipo Ultra-Turrax T10 *basic* (MERSE, São Paulo, Brasil). Alíquotas deste homogenado foram separadas para o ensaio da colina acetil transferase (ChAT) e da acetilcolinesterase (AChE) e para quantificação do teor total de proteínas presente no tecido. O restante do tecido homogeneizado foi então sedimentado através de centrifugação a $39000 \times g$ durante 15 min. O pellet gerado foi ressuscitado com adição do mesmo volume de tampão foi novamente homogeneizado. A seguir o tecido era novamente centrifugado e novamente ressuscitado no mesmo tampão, mas desta vez com $\frac{1}{4}$ do volume original e utilizando um pistilo de teflon (*Teflon pestle*). Este processo resulta no rompimento das membranas celulares e o homogenado final é uma fração de membrana. Aliquotas da fração de membrana foram utilizadas para quantificação dos receptores nicotínicos de acetilcolina subtipo $\alpha 4\beta 2$ e do transportador pré-sináptico de colina.

A medição de receptores nicotínicos de acetilcolina subtipo $\alpha 4\beta 2$ (nAChR), a marcação por [^3H]citisina (Abreu-Villaça et al. 2003, 2004b) foi realizada com as alíquotas da suspensão de membrana (duas alíquotas para marcação total e duas para marcação não-específica). Neste sentido, à cada amostra de marcação total foi acrescentada uma solução contendo concentração final de 2nM [^3H]citisina em um volume total 250 μl de 120mM NaCl, 5mM KCl, 2.5mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 e 50mM Tris HCl (pH 7,4). Para avaliar a marcação inespecífica, às alíquotas contendo tecido e a solução descrita acima foram acrescentados 100 μM de nicotina. A nicotina foi utilizada para deslocar a [^3H]citisina do sítio específico de marcação, ou seja, os receptores $\alpha 4\beta 2$. O material era então incubado a 4°C durante 75 min.

Após o período de incubação, 3ml de tampão era adicionado para a realização da filtração através do *Cell Harvester* (Brandel, Gaithersburg, Maryland, EUA), sendo seguido por 3 lavagens do preparado de membrana marcado com 4ml de tampão. Os filtros eram previamente tratados com tampão contendo 0,1% de polietilenamina por 30min. As porções de filtro referentes a cada amostra foram coletadas e guardadas em potes plásticos com 5ml de líquido cintilográfico por 12h. A quantificação da radioatividade foi realizada por espectrometria de cintilação líquida. A marcação específica era calculada pela diferença entre a marcação total da amostra e a marcação inespecífica encontrada. O valor encontrado para marcação específica foi corrigido pela quantidade de proteína de membrana existente na amostra. Desta forma, os valores apresentados foram calculados como marcação específica por miligrama de proteína de membrana.

A atividade colinérgica foi avaliada através da ligação ao transportador pré-sináptico de colina por uma molécula de Hemicolinium-3 (HC3) marcado radioativamente (HC-3 tritiado, ou [³H]HC-3). Para as medidas de marcação por [³H]HC-3, quatro alíquotas do mesmo preparado de membrana utilizado para $\alpha 4\beta 2$ foram incubadas por 20min à temperatura de 20°C em tampão fosfato (pH 7,4) e 150mM de NaCl, com a adição de 2nM de [³H]HC-3 em um volume final de 1ml. Para avaliar a marcação inespecífica, duas das alíquotas utilizadas também foram incubadas na presença de uma concentração excedente de 10mM de HC-3 não marcado para deslocar o sítio específico de marcação. Após a incubação, todo o procedimento, desde a filtração até a contagem da radiação, foi realizado como descrito anteriormente. A marcação específica para o transportador de colina era calculada pela diferença entre a marcação total da amostra e a marcação inespecífica encontrada. Os valores para esta marcação também eram corrigidos pela quantidade de proteína de membrana (marcação específica por mg de proteína de membrana).

A densidade colinérgica foi medida através da atividade da colina acetiltransferase (ChAT). Para avaliação da atividade da ChAT, amostras contendo 44 μ L do homogenato geral, ou seja, a suspensão obtida na primeira homogeneização tecidual, foram diluídas em tampão fosfato (pH 7,9) e distribuídas em triplicatas. A cada tubo da triplicata foi adicionada uma mistura contendo NaCl a 200mM, MgCl₂ a 17mM, EDTA a 1mM, Triton X-100 a 0,2% em tampão, fisostigmina a 0,12mM, albumina de soro bovino a 0,6mg/ml, cloreto de colina a 20mM e [¹⁴C]acetil-coenzima A a 50mM (“mix”). Aos “brancos” da reação, foi adicionado tampão de diluição no mesmo volume de tecido que foi adicionado às triplicatas do ensaio e o “mix”. Todos os tubos, entre amostras e brancos, em triplicata, foram pré-incubados por 15min a 4°C e em seguida eram incubados por 3min a 37°C. Sob estas condições a reação

enzimática se passa durante a incubação e a ChAT presente no tecido catalisa a reação de síntese da acetilcolina a partir da [^{14}C]acetil-coenzima A e colina fornecidas às amostras. Uma vez que o substrato de ação da enzima está marcado radioativamente, o produto da reação medido ao final também está, ou seja, há formação de moléculas de acetilcolina acopladas ao átomo de ^{14}C . A fração contendo acetilcolina marcada foi extraída por centrifugação e o sobrenadante foi transferido para tubos plásticos e a ele foi adicionado líquido cintilográfico. A emissão radioativa foi mensurada por espectrometria de cintilação líquida. A atividade da enzima era expressa em relação à concentração de proteínas totais presentes no tecido.

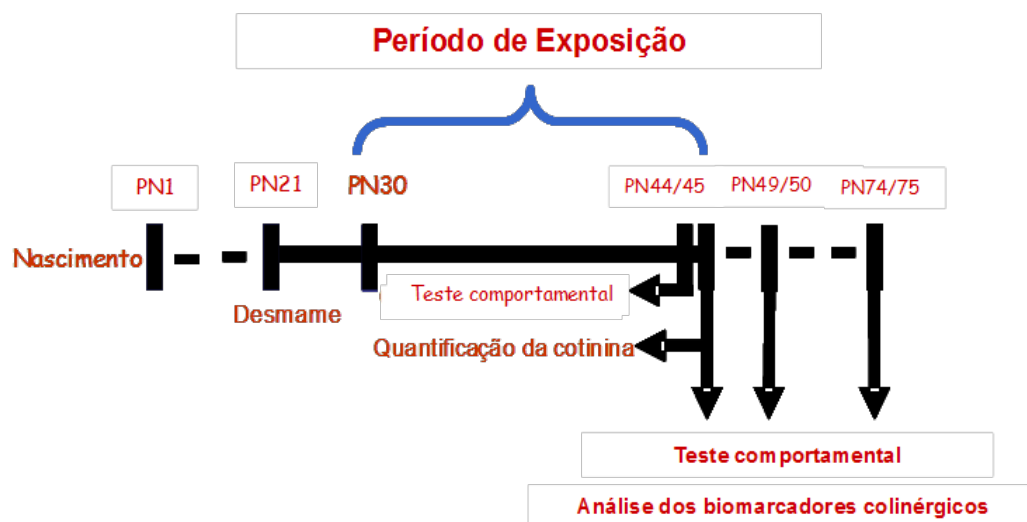
A atividade da acetilcolinesterase foi medida por espectrofotometria comodescrito por Ellman (Ellman e cols., 1961). Os tecidos foram homogeneizados (aproximadamente a 90 mg/mL) em tampão fosfato de sódio (0,12M, pH 7,6) em um homogeneizador tipo Ultra-Turrax T10 basic. A seguir, em uma cubeta de 1 mL, foram adicionados 52 μL do tecido homogeneizado a uma solução contendo 784 μL de tampão fosfato de sódio a 0,12M (pH=7,6), 182,6 μL de ácido ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB, 0,63 mM em tampão fosfato 0,12M, pH7,6) e 182,6 μL de acetiltiocolina (*acetylthiocholine iodide*, 6,6mM em água destilada). Imediatamente após a adição do tecido homogeneizado, a solução foi lida a 412nm, em modo cinético a cada 10 segundos, durante 2 minutos. A absorbância do branco foi subtraída dos valores finais de leitura.

Para obtermos os valores de atividade da acetilcolinesterase em nmoles de produto formado por unidade de tempo, fizemos uma correlação com uma curva padrão de L-cisteína, previamente construída. A curva padrão de L-cisteína (dados não apresentados) foi construída a partir da utilização de diferentes concentrações do aminoácido L-cisteína, o qual reage diretamente com o DTNB sem que seja necessária a hidrólise da molécula ou qualquer reação enzimática.

2.8 Linha Temporal

A figura 4 apresenta a linha temporal dos principais procedimentos realizados neste desenho experimental.

Figura 4 - Linha temporal



Fonte: A autora, 2014.

2.9 Análise estatística

Massa corporal: Os dados foram apresentados como médias e erros padrão. Para os dados obtidos durante a exposição foi realizada análise de variância de repetição (rANOVAs), Tratamento (CT, BaixaNic e AltaNic) e Sexo foram utilizados como fatores e o *Dia* foi considerado como fator de repetição. Foram realizadas ANOVAs separadas para massa corporal durante o período de retirada.

Medidas comportamentais: Os dados foram apresentados como médias e erros padrão. Para reduzir a probabilidade de erros tipo 1 que resultariam da realização de múltiplos testes a partir da mesma base de dados, os resultados foram avaliados primeiro por análises de variância (ANOVAs). Para o LCE e CV, ANOVAs foram realizadas para cada variável (LCE: %Tempo BA, %Entradas BA, Entradas BF, Atividade vertical, Auto-limpeza, Alongamento e Tempo Cen; CV: Orifícios explorados, Cen+PE, Atividade vertical, Auto-limpeza, Alongamento). Tratamento, Idade e Sexo foram usados como fatores.

Sistema colinérgico. Os dados foram apresentados como médias e erros padrão. Os resultados foram avaliados primeiro por ANOVAs em cada variável (nAChR, HC3, ChAT e AChE). Tratamento, Idade e Sexo foram usados como fatores.

ANOVAs de menor ordem foram utilizadas toda vez que interações de Tratamento com outros fatores eram detectadas. Essas determinações foram feitas antes de ser decidido se há

separação por sexo dentro de cada grupo de tratamento. Diferenças entre grupos individuais ou diferenças entre as idades foram analisadas utilizando FPLSD (*Fisher Protected Least Significant Difference*) como teste *post-hoc*. Entretanto, toda vez que não houve interação entre Tratamento e outros fatores, apenas o efeito do Tratamento é considerado. O valor de significância assumido é de $p < 0,05$ para o efeito do Tratamento. Para interações com $p < 0,1$, foi avaliado também se ANOVAs de menor ordem detectavam efeitos de Tratamento após a subdivisão dos fatores de interação (Snedecor & Cochran, 1967).

3 RESULTADOS

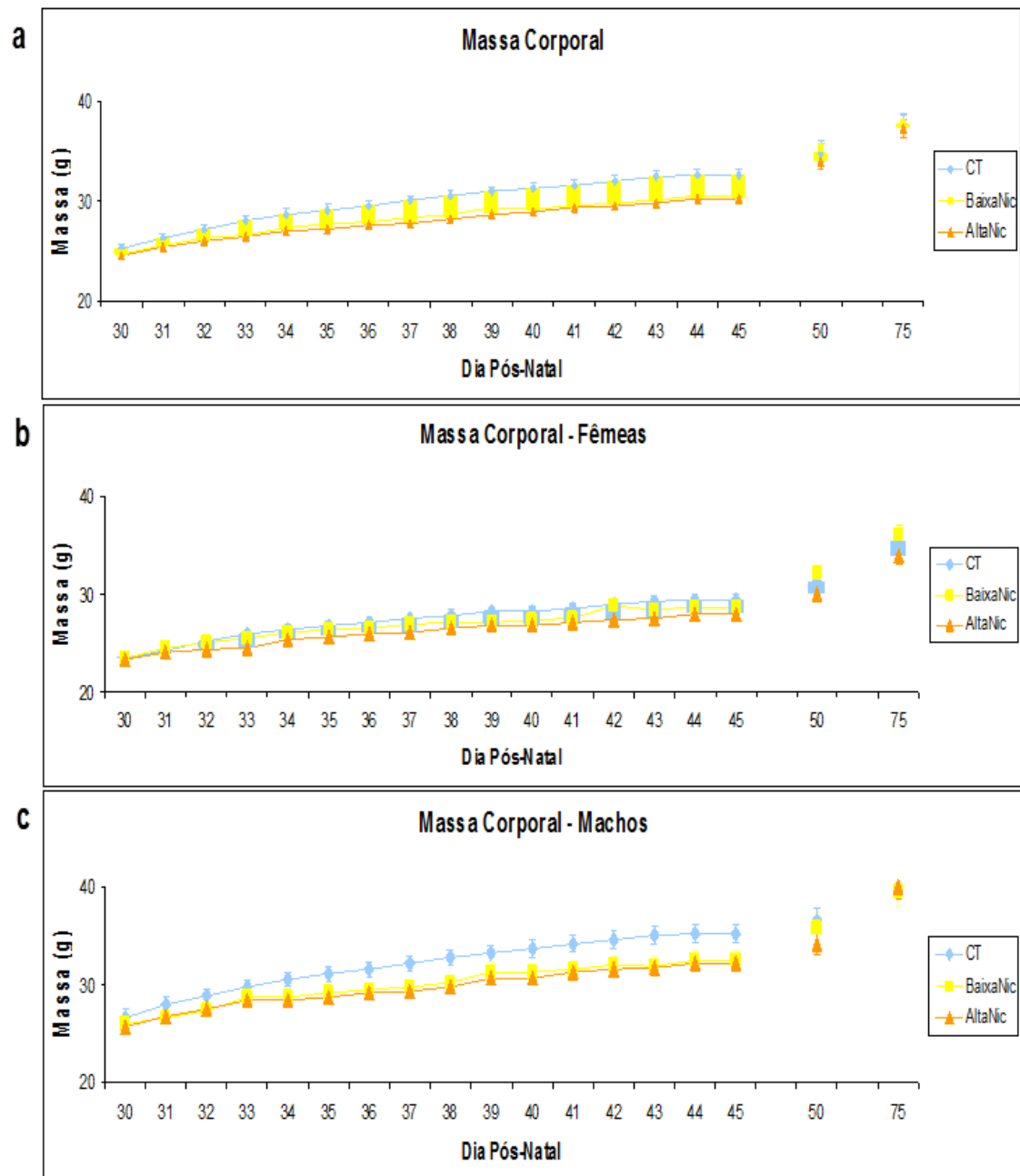
3.1 Níveis de cotinina sérica

Os camundongos expostos a AltaNic apresentaram níveis séricos de cotinina de $109,1 \pm 24,0$ ng/ml. E camundongos CT e expostos a BaixaNic apresentaram níveis de cotinina sérica abaixo do limite de detecção da técnica (< 8 ng/ml).

3.2 Efeitos na massa corporal

Como indicado pela ANOVA, o peso corporal aumentou (*DIA*: $F=451,6$, $df=15$, $P<0,001$) durante o *Período de Exposição* (PN30-PN45) e como esperado, os machos foram mais pesados do que as fêmeas (*rANOVA - Sex*: $F=53,9$, $df=1$, $P<0,001$). O efeito de *Tratamento* ($F=4,7$, $df=2$, $P<0,01$) variou ao longo do *Período de Exposição* (*Tratamento* \times *Dia*: $F=4,1$, $df=30$, $P<0,001$): Os grupos AltaNic e BaixaNic apresentaram menor peso corporal quando comparado ao grupo CT a partir do terceiro dia ($P<0,05$, FPLSD). Apesar de significativas, as diferenças entre os grupos foram de pequena magnitude. Diferenças entre os grupos CT e BaixaNic variaram de 4,8% a partir do terceiro dia a 6,4% no último dia de exposição, enquanto diferenças entre os grupos AltaNic e CT variaram de 5,8% no terceiro dia a 7,4% no último dia de exposição. Os efeitos do tratamento não foram identificados após o final da exposição, tal como indicado pela análise de massa corporal durante a retirada (Figura 5).

Figura 5 - Massa corporal dos animais dos três grupos experimentais durante o tratamento e após seu término



Legenda: **a e b**) A massa corporal aumentou de PN 30 – 45 tanto para machos quanto para fêmeas. **(c)** Machos foram mais pesados que as fêmeas.

Nota: Os grupos AltaNic e BaixaNic apresentaram menor peso corporal quando comparado ao CT desde o 3º dia até o final do período de exposição. Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). * $P > 0,05$ AltaNic e BaixaNic vs. CT como demonstrado pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

3.3 Medidas comportamentais clássicas

Com o objetivo de simplificar a apresentação dos resultados, os dados estatísticos obtidos pela utilização de ANOVAs realizadas para cada variável comportamental clássica, utilizando como fatores Tratamento, Idade e Sexo estão apresentadas na tabela 1. Quando houve efeitos de *Tratamento* ou interações entre *Tratamento* e outros fatores, ANOVAs Nos subitens a seguir estão descritos os resultados das ANOVAs de menor ordem.

Nos subitens a seguir, há a descrição dos resultados de ANOVAs de menor ordem realizadas quando interações de Tratamento com outros fatores foram detectadas assim como as diferenças entre grupos individuais descritas pelo teste *post-hoc* FPLSD.

Tabela 3 - Análise estatística global das medidas comportamentais clássicas

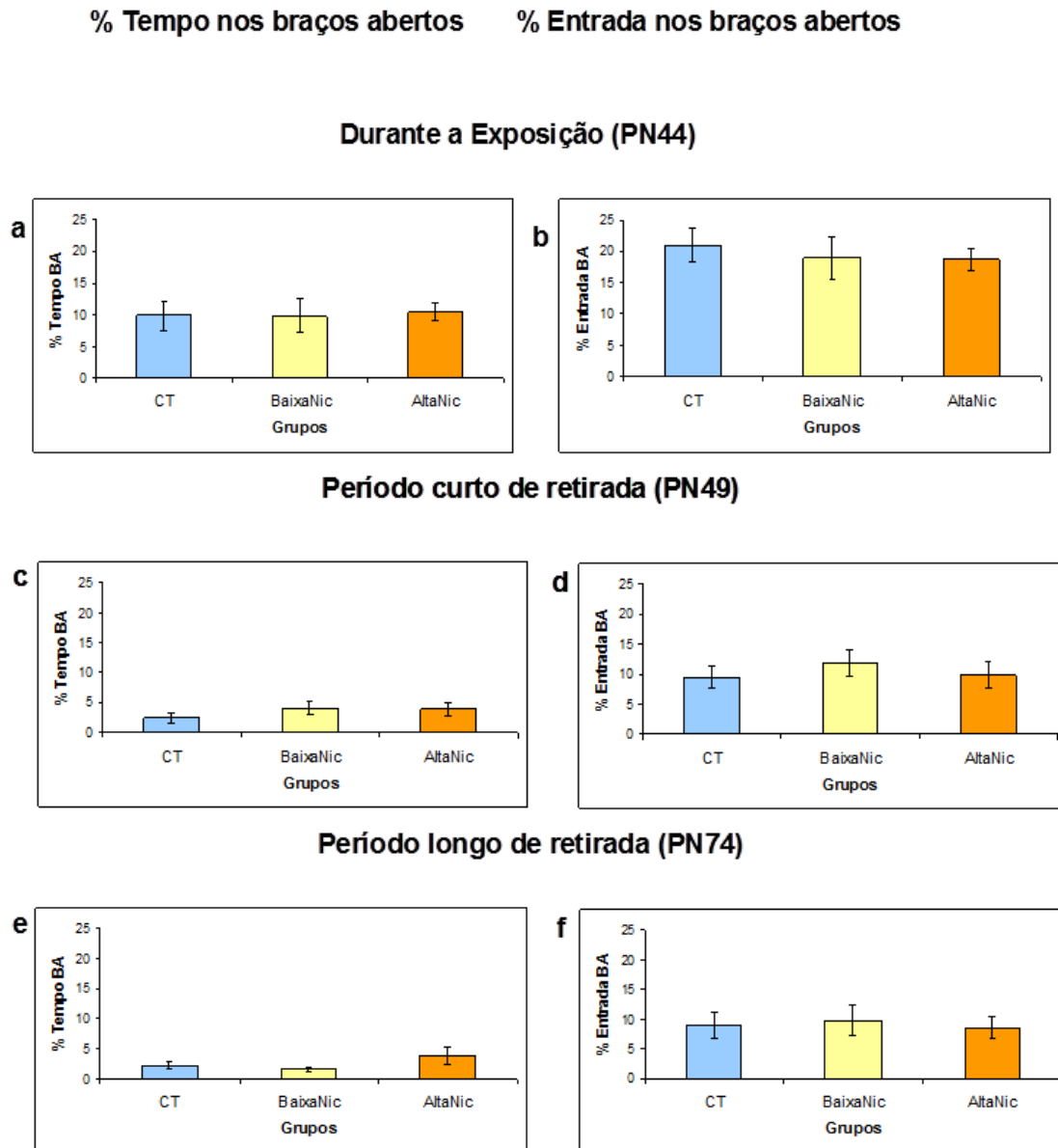
<i>Variáveis Clássicas</i>	<i>Efeitos e Interações</i>
<i>Labirinto em cruz elevado</i>	
Ansiedade (%Tempo BA)	NS
Ansiedade (%Entradas BA)	NS
Atividade locomotora(Entradas BF)	<i>Tratamento</i> : F=7,6, gl=2, P<0,001 <i>Tratamento×Idade</i> : F=2,4, gl =4, P<0,05
<i>Campo vazado</i>	
Busca por novidade (Nº de orifícios explorados)	<i>Tratamento</i> : F=11,5, gl =2, P<0,001 <i>Tratamento×Sexo</i> : F=4,7, gl =2, P<0,05 <i>Tratamento×Idade×Sexo</i> : F=4,3, gl =4, P<0,01
Atividade locomotora(Cen+Pe)	<i>Tratamento</i> : F=6,9, df=2, P<0,01 <i>Tratamento×Idade×Sexo</i> : F=2,6, gl =4, P<0,05

%Tempo BA, percentual de tempo nos braços abertos; %Entradas BA, percentual de entradas nos braços abertos; Entradas BF, percentual de entradas nos braços fechados; Cen+Pe, soma do número de quadrados percorridos no centro e na periferia

3.4 Efeitos no labirinto em cruz elevado

Em relação às medidas clássicas usadas para avaliar comportamento associado a ansiedade no LCE (% Tempo BA e %Entrada BA), as ANOVAs não indicaram efeitos ou interações com *Tratamento* (Tabela 1). Consequentemente, as análises de menor ordem para cada idade ou sexo não foram realizadas. Estes resultados sugerem que não existiram alterações de ansiedade durante o período de exposição e retirada (Figura 6).

Figura 6 - Percentual de tempo e entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE).

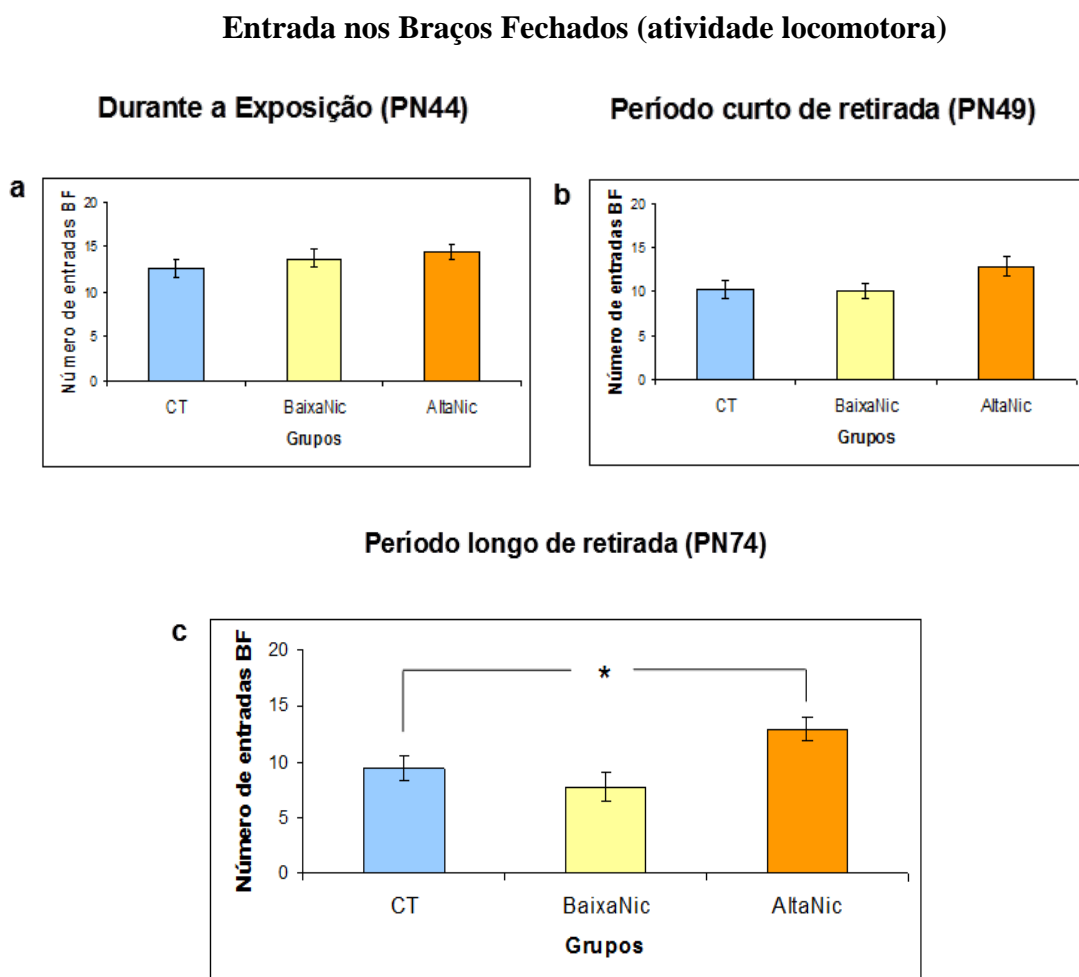


Nota: Não houve efeito significativo nos níveis de ansiedade durante a exposição à fumaça de cigarro (a e b), e no curto (c e d) e longo (e e f) período de retirada. Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a ar durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). % Tempo BA, percentual de tempo nos braços abertos; % Entradas BA, percentual de entrada nos braços abertos.

Fonte: A autora, 2014.

Não existiram efeitos na atividade locomotora (Entrada BF) durante o período de exposição e curto período de retirada (PN44 e PN49 respectivamente), no entanto, houve um efeito tardio (PN74 – *Tratamento*: $F=4,5$, $df=2$, $P<0,05$). Um mês após o final da exposição, o aumento na atividade locomotora em animais do grupo AltaNic obteve significância (HighNIC > CT: $P=0,05$; FPLSD) (Figura 7).

Figura 7 - Atividade locomotora no labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.



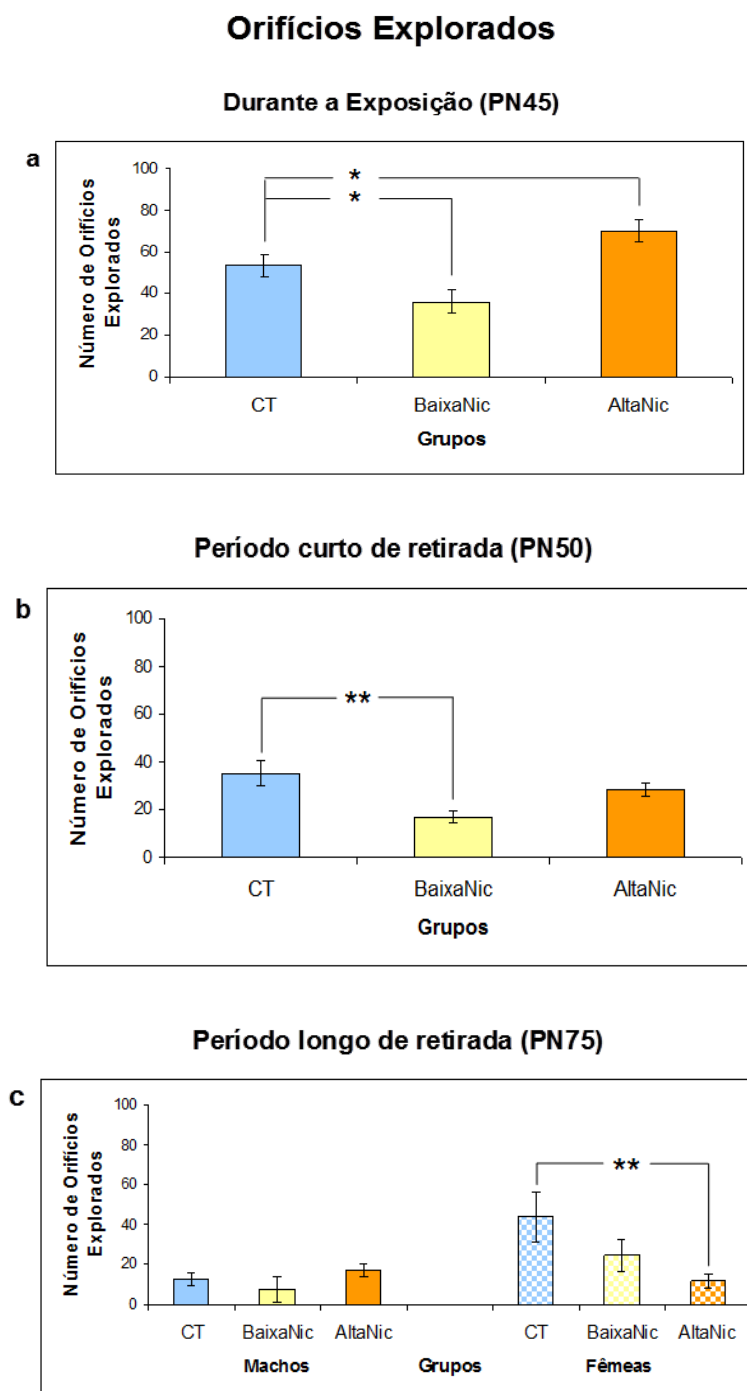
Nota: Não houve efeito significativo na atividade Locomotora durante a exposição à fumaça de cigarro e no curto período de retirada (b). Um mês após o término da exposição (longo período de retirada) (c), houve aumento da atividade no grupo AltaNic quando comparado ao grupo CT. Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). * $P<0,05$, diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

3.5 Efeitos no campo vazado

Em relação ao número de orifícios explorados, as análises separadas para cada idade indicaram efeitos significativos durante a exposição à fumaça de cigarro (PN45 – *Tratamento*: $F=9,8$, $df=2$, $P<0,001$) e na retirada (PN50 – *Tratamento*: $F=5,6$, $df=2$, $P<0,01$; PN75 – *Tratamento*: $F=3,4$, $df=2$, $P<0,05$). Durante a exposição, o grupo BaixaNic explorou menos orifícios ($P<0,05$; FPLSD) enquanto o grupo AltaNic explorou mais orifícios ($P<0,05$; FPLSD) quando comparado ao grupo CT. Durante o curto período de retirada, o grupo BaixaNic continuou explorando menos orifícios ($P<0,01$; FPLSD) enquanto que durante o longo período de retirada, o efeito foi sexo-dependente (*Tratamento* \times *Sexo*: $F=5,7$, $df=2$, $P<0,01$) e restrito às fêmeas (*Tratamento*: $F=4,7$, $df=2$, $P<0,05$). Houve uma diminuição tardia no número de orifícios explorados por fêmeas do grupo AltaNic quando comparado ao grupo CT ($P<0,01$; FPLSD) (Figura 8).

Figura 8 - Número de orifícios explorados no campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.

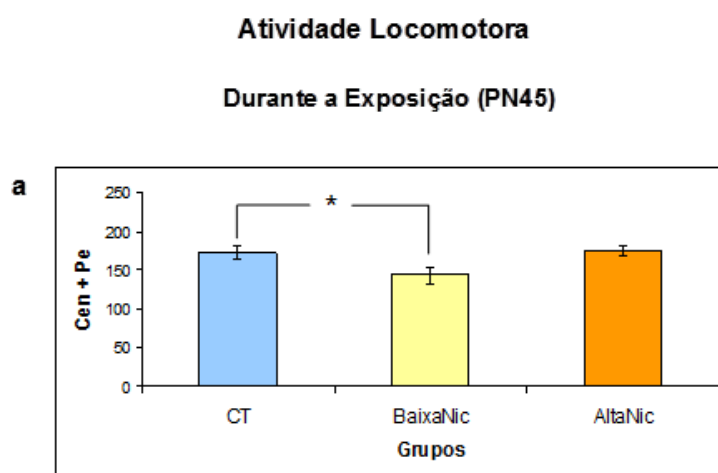


Nota: Durante a exposição (a), o grupo BaixaNic explorou menos orifícios enquanto o grupo AltaNic explorou mais orifícios quando comparado ao grupo CT. Durante o curto período de retirada (b), o grupo BaixaNic explorou menos orifícios. Durante o longo período de retirada (c), o efeito foi sexo-dependente e restrito às fêmeas. Houve uma diminuição tardia no número de orifícios explorados por fêmeas do grupo AltaNic quando comparado ao grupo CT. Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$, diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

Durante a exposição (*Tratamento*: $F=3,7$, $df=2$, $P<0,05$), o grupo BaixaNic apresentou redução na Atividade locomotora (Cen+Pe) quando comparado ao grupo CT ($P<0,05$; FPLSD), no entanto, durante o curto período de retirada (*Tratamento*: $F=4,6$, $df=2$, $P<0,05$) existiu somente uma tendência na redução na atividade locomotora nos animais de BaixaNic ($P=0,07$; FPLSD). As diferenças entre os grupos não persistiram a longo prazo(Figura 9).

Figura 9 - Atividade locomotora no campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada



Nota: Durante a exposição (**a**), o grupo BaixaNic apresentou redução na atividade locomotora quando comparado ao grupo CT. No curto período de retirada (**b**), existiu somente uma tendência na redução na atividade locomotora nos animais de BaixaNic. No longo período de retirada (**c**), não houve diferenças significativas entre os grupos. Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). Cen, centro do CV; Pe, periferia do CV. * $P<0,05$, PS = Próximo a significância ($0,05>P<0,1$). Diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

3.6 Medidas etológicas

Com o objetivo de simplificar a apresentação dos resultados, os dados estatísticos obtidos pela utilização de ANOVAs realizadas para cada variável comportamental etológica, utilizando como fatores Tratamento, Idade e Sexo estão apresentadas na tabela 2. Quando houve efeitos de *Tratamento* ou interações entre *Tratamento* e outros fatores, ANOVAs Nos subitens a seguir estão descritos os resultados das ANOVAs de menor ordem

Nos subitens a seguir, há a descrição dos resultados de ANOVAs de menor ordem realizadas quando interações de Tratamento com outros fatores foram detectadas assim como as diferenças entre grupos individuais descritas pelo teste *post-hoc* FPLSD.

Tabela 4 - Análise estatística global das medidas comportamentais etológicas

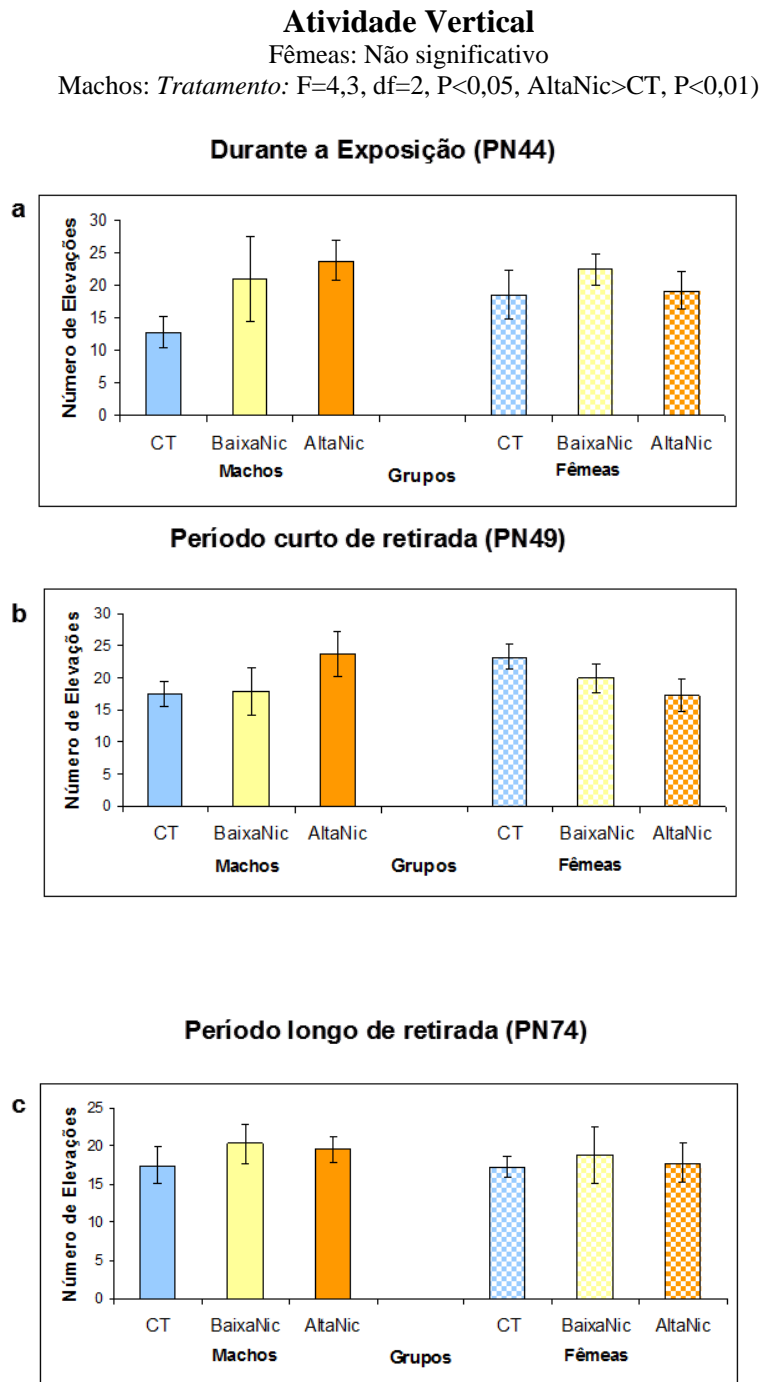
<i>Variáveis Etológicas</i>	<i>Efeitos e Interações</i>
<i>Labirinto em cruz elevado</i>	
Atividade vertical	<i>Tratamento</i> × <i>Sexo</i> : F=3,2, gl =2, P<0,05
Auto-limpeza	<i>Tratamento</i> : F=3,9, gl =2, P<0,05 <i>Tratamento</i> × <i>Idade</i> : F=3,7, gl =4, P<0,01 <i>Tratamento</i> × <i>Idade</i> × <i>Sexo</i> : F=2,7, gl =4, P<0,05
Alongamentos para o BA	<i>Tratamento</i> : F=4,1, gl =2, P<0,05 <i>Tratamento</i> × <i>Idade</i> : F=4,8, gl =4, P<0,01
Tempo no centro	<i>Tratamento</i> : F=7,5, gl =2, P<0,001 <i>Tratamento</i> × <i>Idade</i> : F=2,3, gl =4, P=0,06
<i>Campo vazado</i>	
Atividade vertical	NS
Auto-limpeza	<i>Tratamento</i> × <i>Idade</i> : F=3,4, gl =4, P<0,01 <i>Tratamento</i> × <i>Sexo</i> : F=3,0, gl =2, P=0,05 <i>Tratamento</i> × <i>Idade</i> × <i>Sexo</i> : F=2,2, gl =4, P<0,07
Alongamentos para o centro	<i>Tratamento</i> × <i>Idade</i> : F=2,9, gl =4, P<0,05 <i>Tratamento</i> × <i>Idade</i> × <i>Sexo</i> : F=2,2, gl =4, P=0,07

Fonte: A autora, 2014.

3.7 Efeitos no Labirinto em cruz elevado

Os efeitos na atividade vertical (Rodgers e cols., 1997; Rodgers & Dalvi, 1997) foram sexo-dependentes (*Tratamento* × *Sexo*). Não existiram interações *Tratamento* × *Idade*, conseqüentemente, testes de menor ordem nas diferentes idades não foram justificadas (Tabela 2). Após a separação por sexo, os efeitos foram restritos aos machos (*Tratamento*: $F=4,3$, $df=2$, $P<0,05$). Houve aumento na atividade vertical dos machos do grupo AltaNic quando comparado aos machos CT ($P<0,01$; FPLSD).

Figura 10 - Atividade vertical no labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada

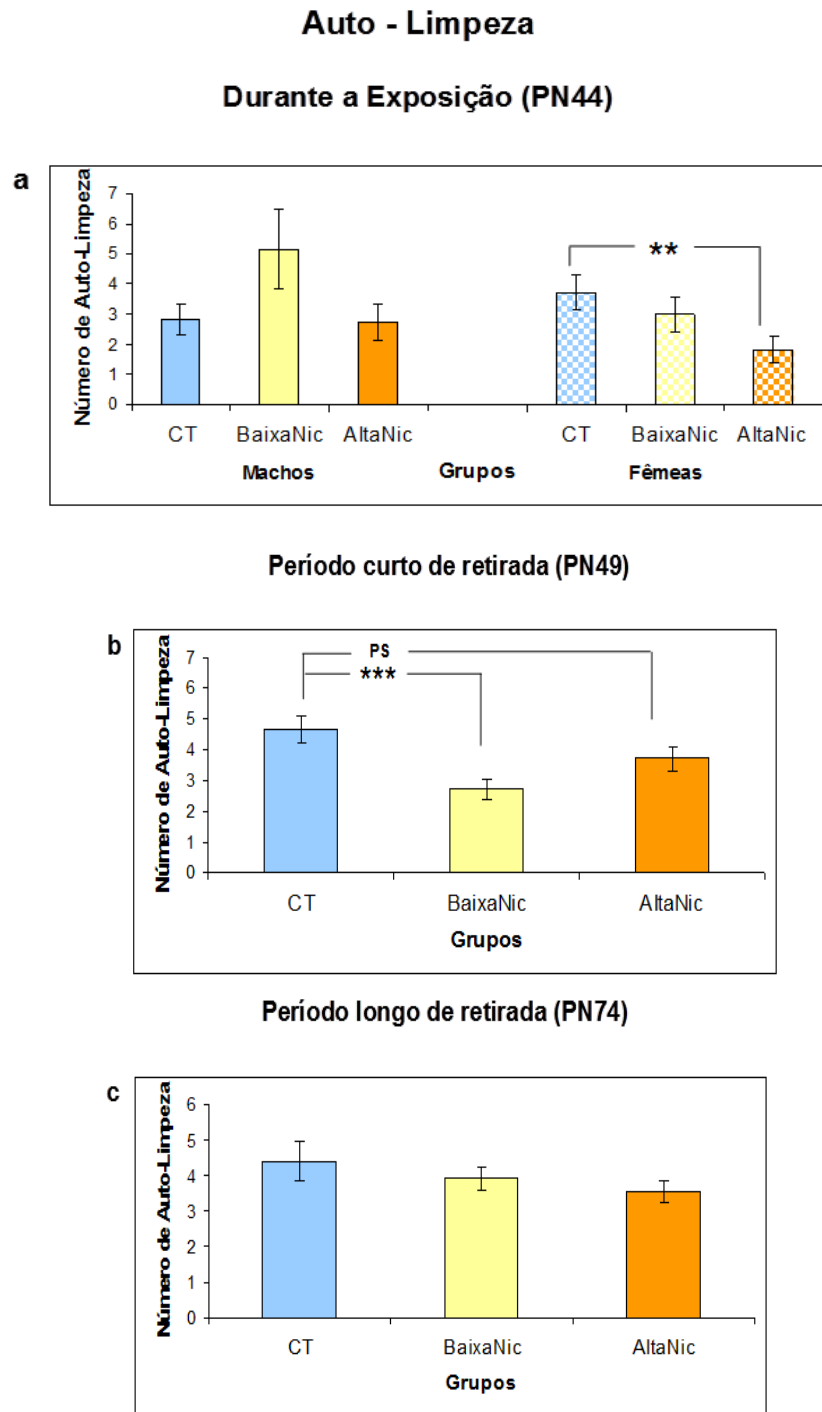


Nota: Houve um aumento na atividade vertical dos machos do grupo AltaNic quando comparado aos machos do grupo CT ($P<0,01$; FPLSD). Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). Diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

A auto-limpeza apresentou efeitos distintos dependendo da idade (Tabela 2). A exposição à fumaça de cigarro (PN44 - *Tratamento*: $F=4,0$, $df=2$, $P<0,05$) e o curto período de retirada (PN49 - *Tratamento*: $F=6,9$, $df=2$, $P<0,01$) provocaram alterações comportamentais significativas. Durante a exposição, o efeito foi dependente do sexo (*Tratamento* \times *Sexo*: $F=2,6$, $df=2$, $P=0,08$) e restrito para fêmeas (*Tratamento*: $F=4,1$, $df=2$, $P<0,05$), as quais apresentaram diminuição na auto-limpeza no grupo AltaNic quando comparado ao grupo CT ($P=0,01$, FPLSD). Durante o curto período de retirada, ambos os camundongos machos e fêmeas apresentaram diminuição na auto-limpeza como efeito significativo no grupo BaixaNic (BaixaNic < CT: $P<0,001$; FPLSD) e uma tendência a valores reduzidos para o grupo AltaNic (AltaNic < CT: $P=0,06$; FPLSD) (Figura 11).

Figura 11 - Auto-limpeza no labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.

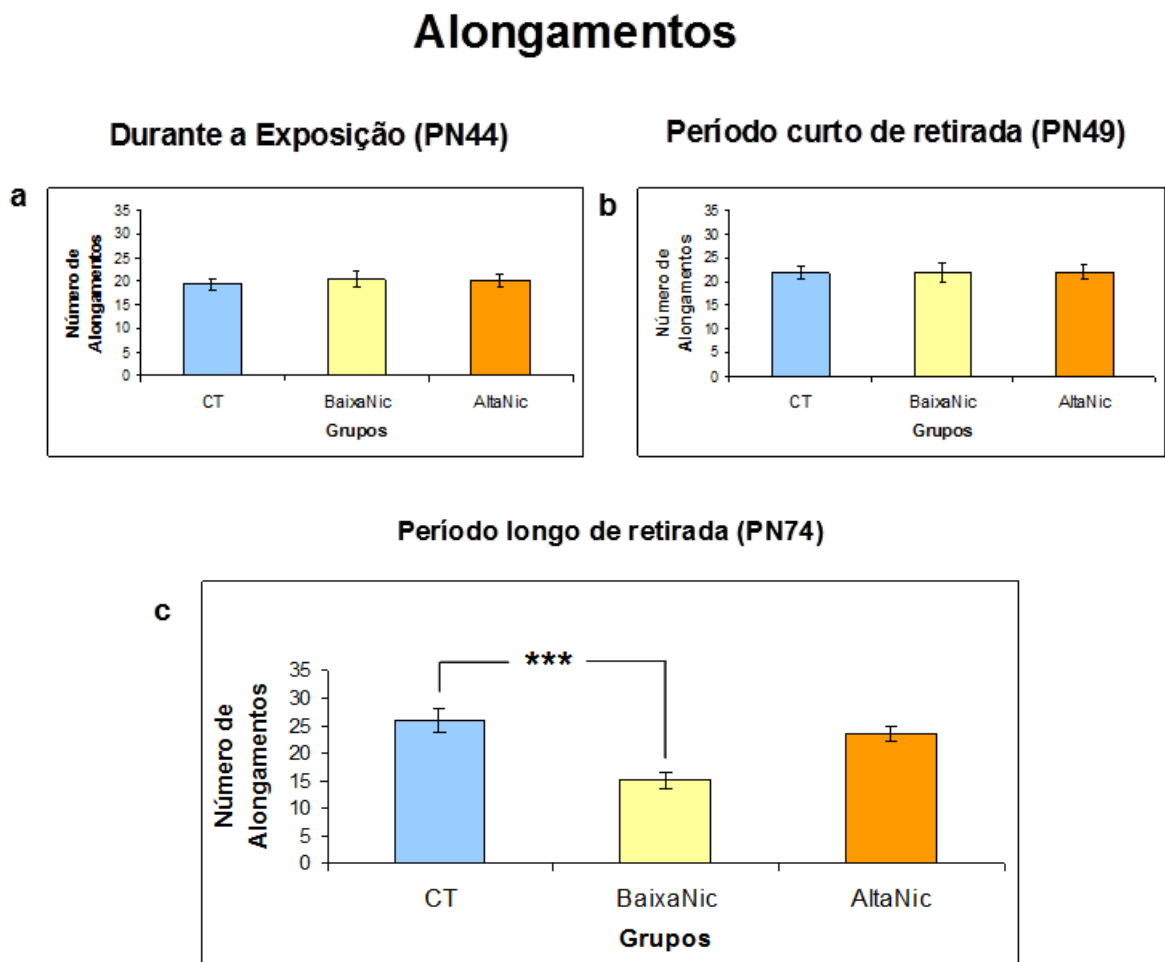


Nota: Durante a exposição (a), o efeito foi dependente do sexo e restrito para fêmeas que apresentaram diminuição na auto-limpeza no grupo AltaNic quando comparado ao grupo CT. Durante o curto período de retirada (b), ambos os camundongos machos e fêmeas apresentaram diminuição na auto-limpeza com efeito significativo no grupo BaixaNic (BaixaNic < CT: $P < 0,001$; FPLSD) e uma tendência a valores reduzidos para o grupo AltaNic (AltaNic < CT: $P = 0,06$; FPLSD). Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, PS = Próximo a significância ($0,05 > P < 0,1$). Diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

A análise de alongamento, uma medida de avaliação de risco (Rodgers e cols., 1997; Rodgers & Dalvi, 1997) não indicou efeitos significativos durante a exposição nem durante o curto período de retirada (PN44 e PN49 respectivamente), no entanto, houve um efeito tardio um mês após a exposição (PN74 - *Tratamento*: $F=10,7$, $df=2$, $P<0,001$). Os animais do grupo BaixaNic apresentaram diminuição do alongamento na direção dos braços abertos do LCE ($P<0,001$; FPLSD) (Figura 12).

Figura 12 - Alongamentos em direção aos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.



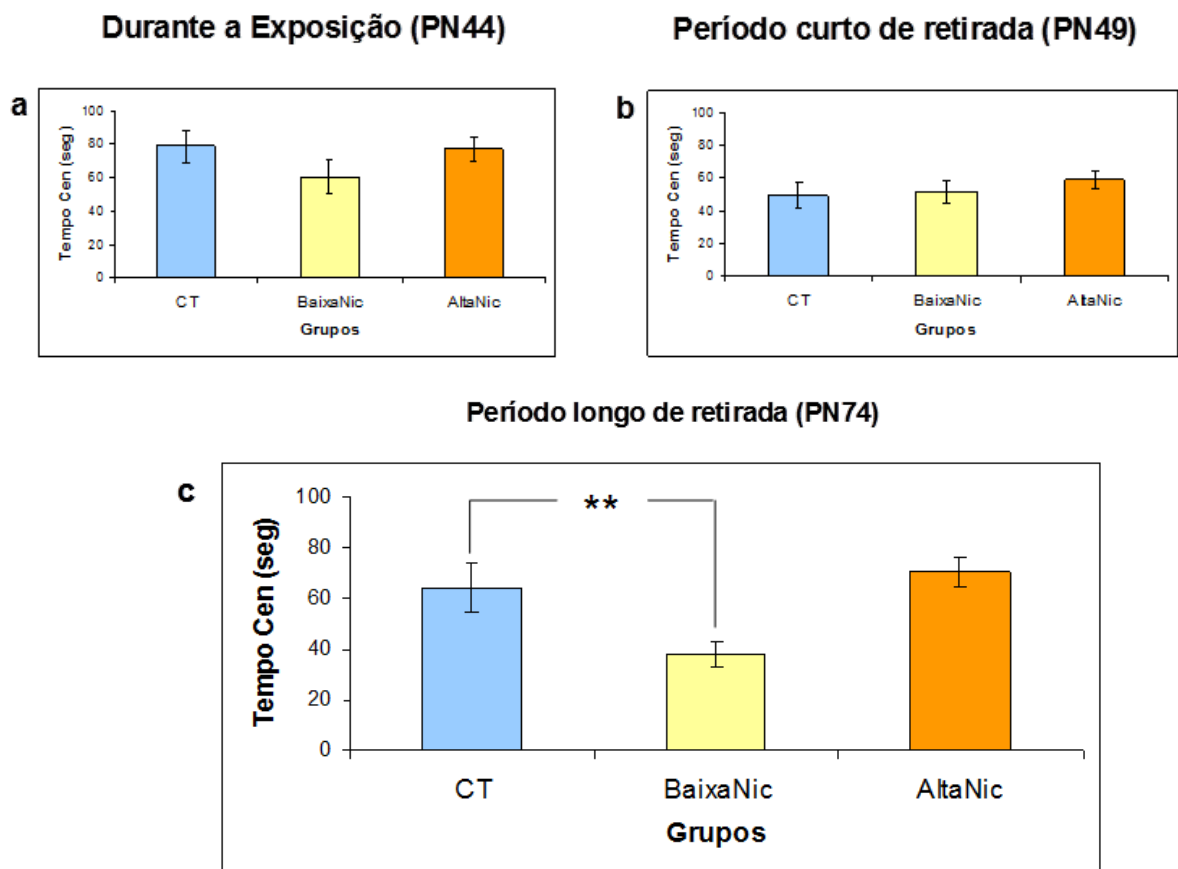
Nota: Apesar de não ter havido diferenças entre os grupos durante a exposição (a) e no curto período de retirada (b), um mês após o término da exposição (c) os animais do grupo BaixaNic apresentaram diminuição no número de alongamento. Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). *** $P<0,001$. Diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

Similarmente, a medida de tomada de decisão (Tempo Cen) não foi alterada pela exposição à fumaça e curto período de retirada (PN44 e PN49 respectivamente), no entanto, a ANOVA detectou um efeito tardio (PN74 - *Tratamento*: $F=6,6$, $df=2$, $P<0,01$). Os animais do grupo BaixaNic apresentaram diminuição no tempo gasto no centro do LCE um mês após a exposição ($P<0,01$; FPLSD) (Figura 13).

Figura 13 - Tempo de permanência no centro do labirinto em cruz elevado (LCE) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada

Tomada de decisão



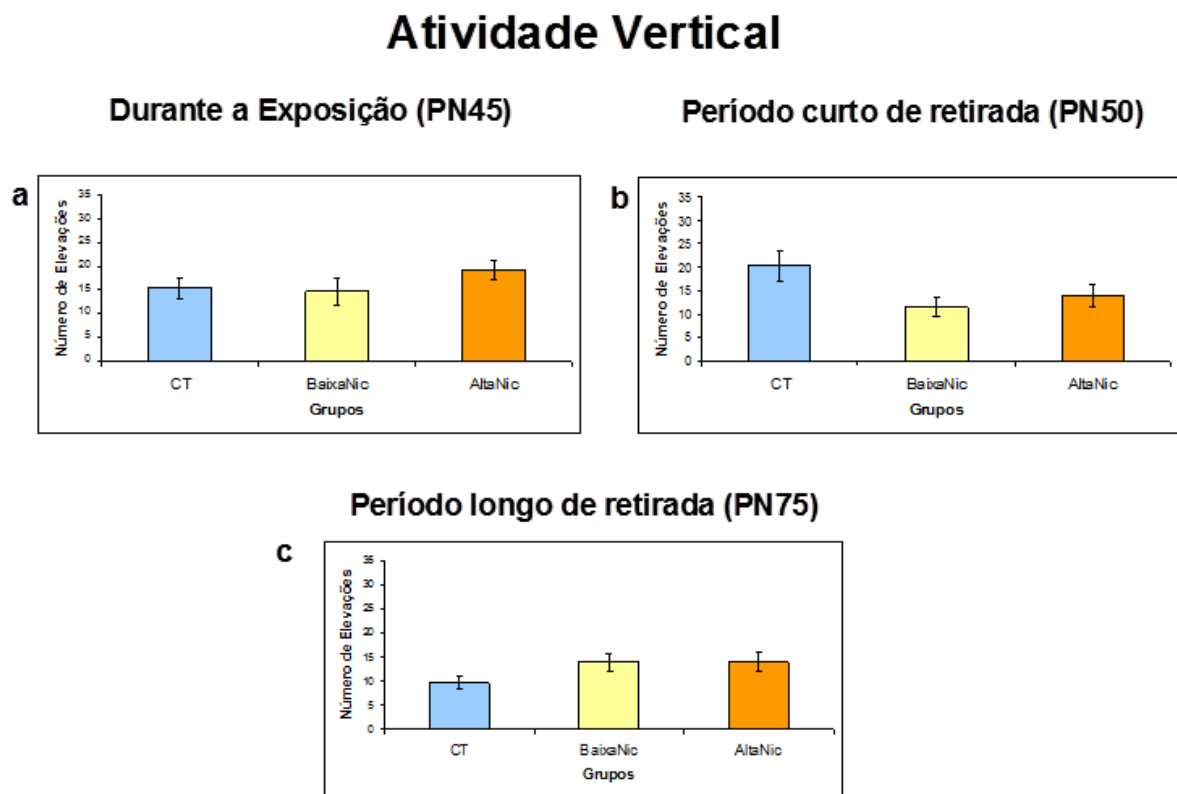
Nota: Apesar de não ter havido diferenças entre os grupos durante a exposição (a) e no curto período de retirada (b), um mês após o término da exposição, os animais do grupo BaixaNic apresentaram diminuição do tempo no centro do LCE. Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). Tempo Cen, tempo de permanência no centro do LCE. $**P<0,01$. Diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

3.8 Efeitos no Campo vazado

Quanto a atividade vertical, a ANOVA inicial não indicou efeitos de tratamento e interações (Tabela 2). Assim, análise de menor ordem para cada idade ou sexo não foram justificadas (Figura 14).

Figura 14 - Atividade vertical no campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.



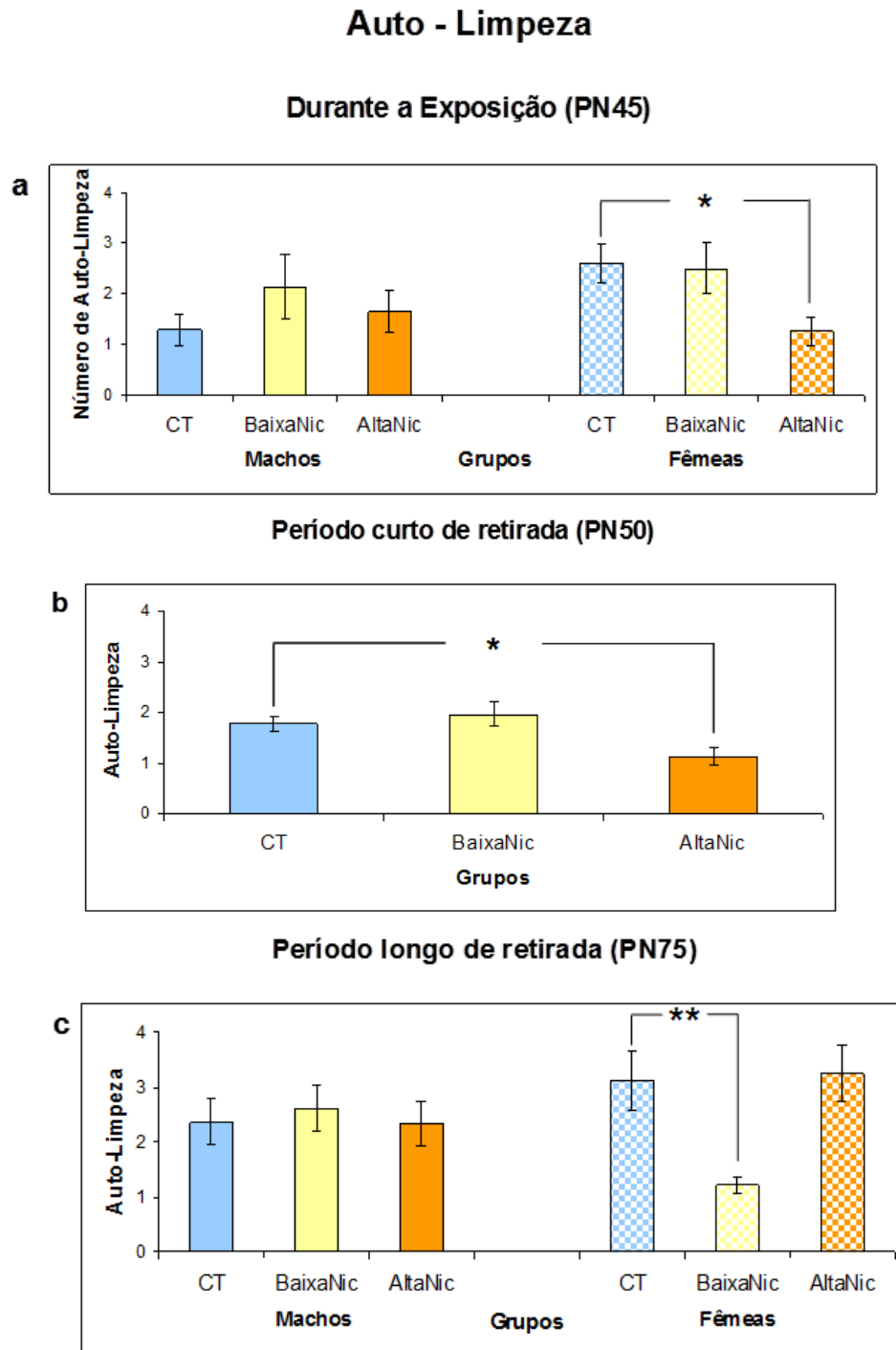
Nota: Não houve efeito significativo na atividade vertical em nenhuma das idades testadas (**a**, **b**, **c**). Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45).

Fonte: A autora, 2014.

Distintamente, a auto-limpeza foi diminuída: A exposição à fumaça de cigarro (PN45 - *Tratamento* \square *Sexo*: $F=2,5$, $df=2$, $P=0,08$), curto período de retirada (PN50 - *Tratamento*: $F=5,3$, $df=2$, $P<0,01$) e longo período de retirada (PN75 - *Tratamento* \square *Sexo*: $F=4,6$, $df=2$, $P<0,05$) induziram alterações comportamentais significativas. Durante a exposição, os efeitos foram restritos a fêmeas (*Tratamento*: $F=4,5$, $df=2$, $P<0,05$), as quais apresentaram

diminuição na auto-limpeza no grupo AltaNic quando comparado ao grupo CT ($P < 0,05$, FPLSD). Durante o curto período de retirada, ambos os camundongos machos e fêmeas apresentaram diminuição na auto-limpeza, com efeito significativo no grupo AltaNic (AltaNic < CT: $P < 0,05$, FPLSD). No longo período de retirada, os efeitos foram evidentes nas fêmeas (*Tratamento*: $F=6,8$, $df=2$, $P < 0,01$), houve uma diminuição tardia no grupo BaixaNic quando comparado ao grupo CT ($P < 0,01$, FPLSD) (Figura 15).

Figura 15 - Auto-limpeza no campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.

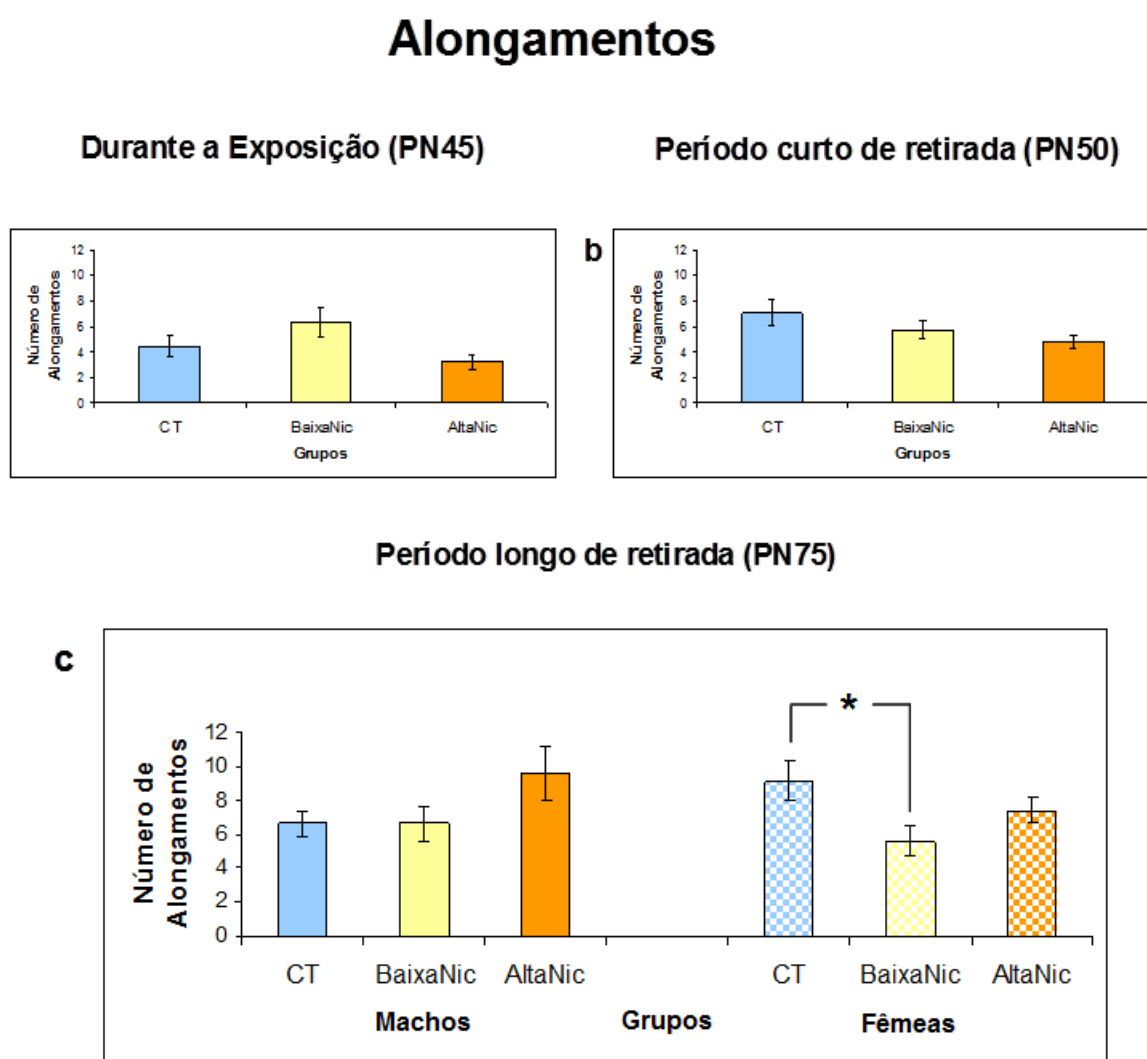


Nota: Durante a exposição (a), os efeitos foram restritos a fêmeas que apresentaram diminuição na auto-limpeza no grupo AltaNic quando comparado ao grupo CT. Durante o curto período de retirada (b), ambos os camundongos machos e fêmeas apresentaram diminuição na auto-limpeza, com efeito significativo no grupo AltaNic. No longo período de retirada (c), o efeito foi sexo-dependente e evidente nas fêmeas; houve uma diminuição tardia no grupo BaixaNic quando comparado ao grupo CT. Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$. Diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

A análise do número de alongamentos no centro+periferia do campo vazadonão apresentou efeito significativo durante a exposição e o curto período de retirada (PN45 e PN50 respectivamente), no entanto, houve um efeito tardio no longo período de retirada (PN75 - *Tratamento* \times *Sexo*: $F=2,4$, $df=2$, $P=0,09$). As fêmeas do grupo BaixaNic apresentaram diminuição do alongam entono centro do CV ($P<0,05$; FPLSD) (Figura 16).

Figura 16 - Número de alongamentos no centro+periferia do campo vazado (CV) durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.



Nota: Não houve diferenças entre os grupos durante a exposição e no período curto de retirada (a e b respectivamente). Um mês após o término da exposição (c) houve um efeito tardio e sexo-dependente. As fêmeas do grupo BaixaNic apresentaram diminuição no número de alongamentos do CV ($P<0,01$; FPLSD). Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a AR durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). $**P<0,01$. Diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

3.9 Medidas Colinérgicas

Com o objetivo de simplificar a apresentação dos resultados, os dados estatísticos obtidos pela utilização de ANOVAs realizadas para cada variável comportamental etológica, utilizando como fatores Tratamento, Idade e Sexo estão apresentadas na tabela 2. Quando houve efeitos de *Tratamento* ou interações entre *Tratamento* e outros fatores, ANOVAs Nos subitens a seguir estão descritos os resultados das ANOVAs de menor ordem.

Nos subitens a seguir, há a descrição dos resultados de ANOVAs de menor ordem realizadas quando interações de Tratamento com outros fatores foram detectadas assim como as diferenças entre grupos individuais descritas pelo teste *post-hoc* FPLSD.

Tabela 5 - Análise estatística global do sistema colinérgico cortical

<i>Variáveis analisadas</i>	<i>Efeitos e Interações</i>
<i>Ligação ao nAChR</i>	<i>Tratamento: F=4,8, gl=2, P<0,01</i> <i>Tratamento × Idade: F=5,7, gl=4, P<0,001</i> <i>Tratamento × Idade × Sexo: F=3,8, gl=4, P<0,05</i>
<i>Ligação ao transportador pré-sináptico de colina</i>	<i>Tratamento × Idade: F=7,3, gl=4, P<0,001</i> <i>Tratamento × Sexo: F=5,8, gl=2, P<0,01</i> <i>Tratamento × Idade × Sexo: F=19,4, df=4, P<0,001</i>
<i>Atividade da CHAT</i>	<i>Tratamento: F=10,3, gl=2, P<0,001</i> <i>Tratamento × Idade: F=2,4, gl=4, P<0,05</i> <i>Tratamento × Idade × Sexo: F=3,8, gl=4, P<0,01</i>
<i>Atividade da AChE</i>	NS

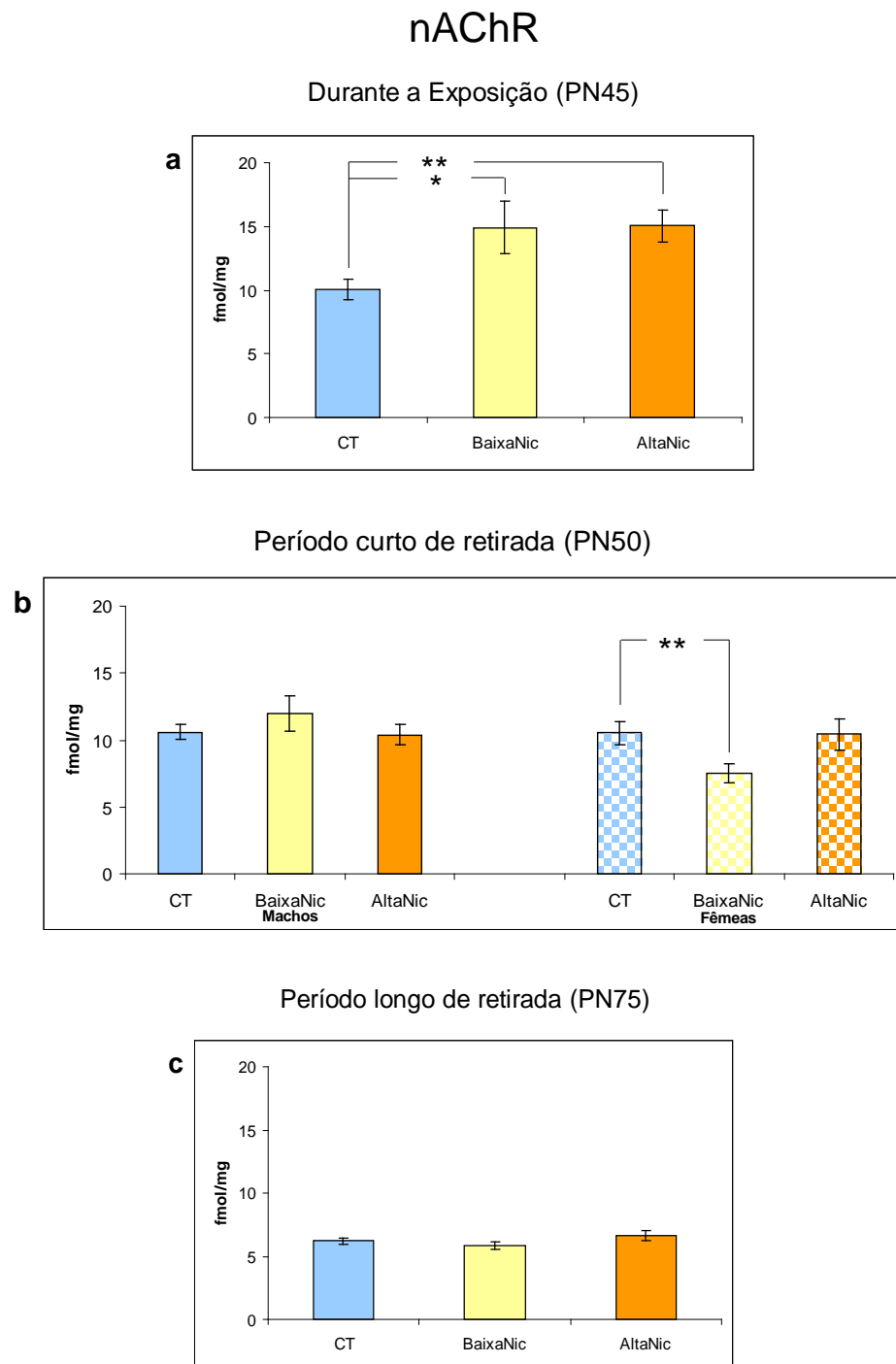
Nota: nAChR, receptor nicotínico colinérgico; CHAT, colina acetiltransferase; AChE, acetilcolinesterase
Fonte: A autora, 2014.

3.10 Efeitos na ligação da citisina aos nAChRs

A exposição de camundongos adolescentes a fumaça de cigarros teve profundo efeito na ligação do agonista citisina aos nAChRs (Efeito do *Tratamento*). Estes efeitos estão expressados distintamente dependendo da idade e sexo (Interação *Tratamento* × *Idade*; Interação *Tratamento* × *Idade* × *Sexo*) (Tabela 3). Como resultado, os dados de cada idade foram analisados separadamente. Considerando que *Tratamento* também apresentou interação com *Sexo*, após subdividir os dados, mantivemos esse fator na análise para ver se as interações de tratamento permaneceram detectáveis.

Durante a exposição (*Tratamento*: $F=4.9$, $gl=2$, $P=0.009$), uma robusta suprarregulação de nAChRs foi identificada. Isto foi evidente tanto para o grupo BaixaNic ($P=0.02$, FPLSD) quanto para o grupo AltaNic ($P=0.007$, FPLSD) independente do sexo (Figura 17a). Durante o curto período de abstinência os efeitos foram sexo-dependentes (*Tratamento* × *Sexo*: $F=3.7$, $P=0.030$) e restritos a fêmeas. Enquanto para o grupo de animais AltaNic a ligação ao nAChR retornou a valores semelhantes aos encontrados nos animais VEH, uma infrarregulação significativa dos nAChRs foi evidente nas fêmeas do grupo BaixaNic quando comparadas aos animais controle (Figura 17b). Um mês após o término da exposição, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 17c).

Figura 17 - Ligação da [3H] citisina aos nAChRs durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada



Nota: Houve suprarregulação de receptores durante a exposição a fumaça de cigarro (**a**). No curto período de retirada, fêmeas do grupo LowNic apresentaram infrarregulação de nAChR (**b**). Não houve diferenças entre os grupos um mês após o término da exposição (**c**). Valores são médias \pm erros padrão da média. nAChR, receptor nicotínico colinérgico; CT, camundongos que foram expostos a ar durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

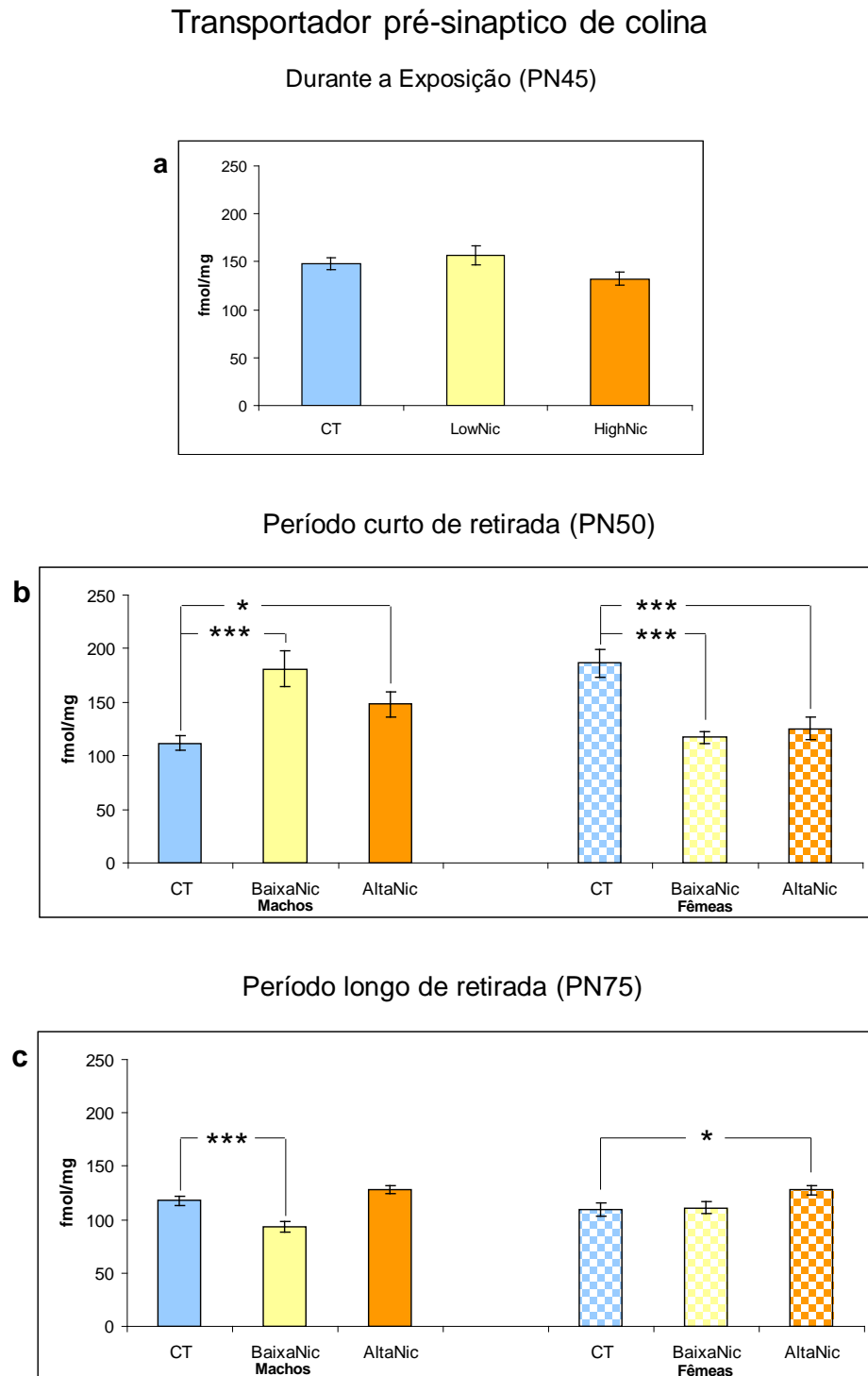
Fonte: A autora, 2014.

3.11 Efeitos na ligação do[3H]HC-3 ao transportador pré-sináptico de colina

A ANOVA que incorpora todos os fatores indicou que os efeitos da fumaça de cigarro foram dependentes da idade e do sexo (Interações *Tratamento* × *Idade*; *Tratamento* × *Sexo*; *Tratamento* × *Idade* × *Sexo*) (Tabela 3). De acordo com isso, os dados foram subdivididos em idades separadas para análise posterior e o fator sexo foi mantido na análise para se observar se as interações com o tratamento permaneciam detectáveis.

Durante a exposição, não houve efeitos significativos (Figura 18a), contudo, durante o curto período de retirada (*Tratamento* × *Sexo*: $F=20.8$, $gl=2$; $P<0.001$) e o longo período de retirada (*Tratamento*: $F=14.0$, $gl=2$; $P<0.001$; *Tratamento* × *Sexo*: $F=3.6$, $gl=2$; $P=0.03$), os efeitos foram dependentes do sexo. Assim, durante o curto período de retirada (Figura 18b), em machos, a ligação ao HC-3 estava aumentada tanto para o grupo de BaixaNic ($P<0.001$, FPLSD) quanto para o grupo de AltaNic ($P=0.049$, FPLSD). Enquanto isso, nas fêmeas, a ligação estava diminuída em ambos os grupos de tratamento (BaixaNic e AltaNic < CT: $P<0.001$, FPLSD). Durante o longo período de retirada (Figura 18c), um padrão diferente aconteceu: em machos, os animais do grupo BaixaNic apresentaram diminuição da ligação do HC-3 (BaixaNic < CT: $P<0.001$, FPLSD), e nas fêmeas, a ligação estava aumentada no grupo AltaNic (AltaNic > CT: $P=0.02$, FPLSD).

Figura 18 - Ligação do [3h]HC-3 ao transportador pré-sináptico de colina durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.



Nota: Não houve diferenças significativas durante a exposição (a). Após o término da exposição, os efeitos foram diferenciados para machos e fêmeas (b e c) Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a ar durante a adolescência (PN30-PN45); BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

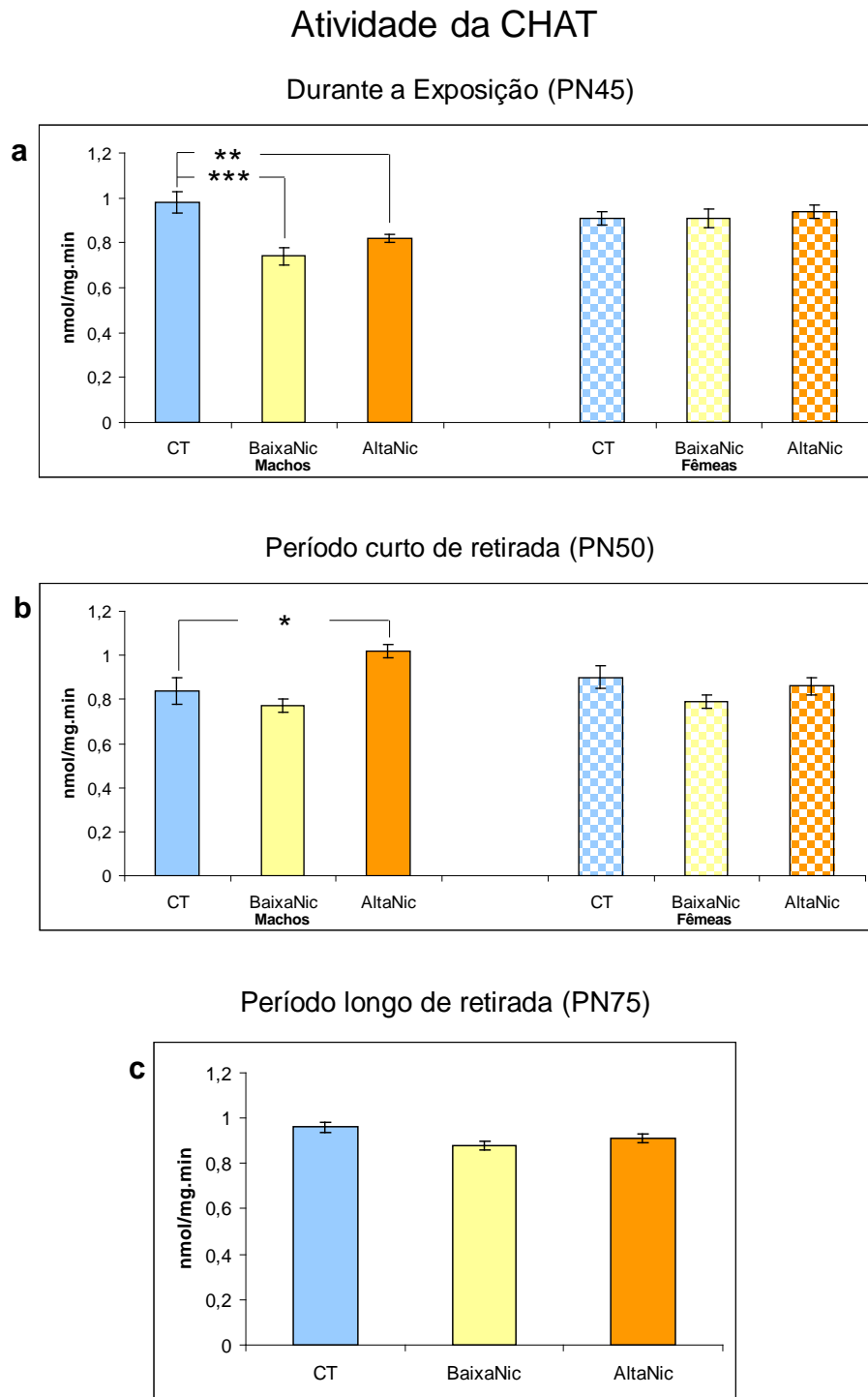
Fonte: A autora, 2014.

3.12 Efeitos na atividade da CHAT

A ANOVA inicial indicou que a exposição a fumaça de cigarros afetou a atividade da CHAT (Efeito *Tratamento*) e os efeitos foram dependentes da idade (Interação *Tratamento* × *Idade*; Interação *Tratamento* × *Idade* × *Sexo*) (Tabela 3). Portanto, os dados foram subdivididos em idades separadas para análise posterior. Considerando que o *Tratamento* também interagiu com o *Sexo*, após a subdivisão dos dados, nós mantivemos este fator na análise.

A análise separada para cada idade indicou efeitos significativos tanto durante a exposição a fumaça de cigarro (PN45 - *Tratamento*: $F=4,4$, $gl=2$; $P=0,016$) quanto no curto período de retirada (PN50 - *Tratamento*: $F=6,1$, $gl=2$; $P=0,003$). Em ambas as idades o efeito foi sexo dependente (*Tratamento* × *Sexo*: PN45 - $F=4,3$; $gl=2$; $P=0,016$, PN50 - $F=3,4$, $gl=2$; $P=0,042$) e restrito aos machos. Assim, durante a exposição (figura 19a), tanto os machos do grupo BaixaNic ($P<0,001$; FPLSD) quanto do grupo AltaNic ($P=0,009$; FPLSD) apresentaram redução da atividade da CHAT quando comparados aos animais do grupo controle. Durante o curto período de retirada (figura 19b), a atividade voltou aos níveis normais nos animais do grupo BaixaNic enquanto os animais do grupo AltaNic apresentaram aumento da CHAT ($P=0,010$; FPLSD). Esses efeitos não foram persistentes a longo prazo (figura 19c).

Figura 19 - Atividade da CHAT durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada.



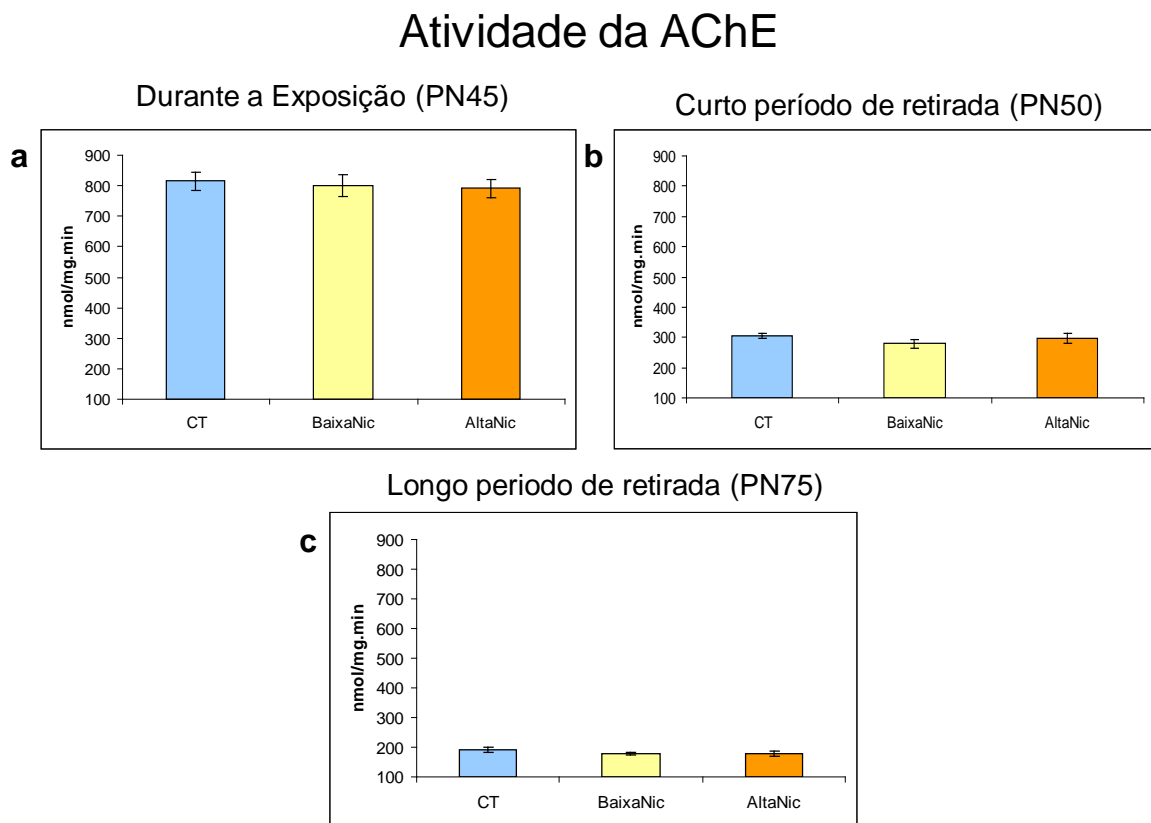
Nota: Durante a exposição, machos em ambos os grupos expostos a fumaça de cigarros tiveram redução da atividade da ChAT (a). No curto período de retirada, machos HighNic apresentaram aumento da atividade (b). Não houve alterações no longo prazo (c). Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a ar durante a adolescência (PN30-PN45); CHAT, colina acetiltransferase; BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, diferenças entre os grupos são demonstradas pelo FPLSD.

Fonte: A autora, 2014.

3.13 Efeitos na atividade da AChE

Em relação a AChE, a ANOVA inicial considerando os fatores *Tratamento*, *Idade* e \square *Sexo* não indicou efeitos do *Tratamento* nem interações (Tabela 3). De acordo com isso, as análises de menor ordem para cada idade ou sexo não foram justificadas. Esse resultado sugere que não houve alteração na síntese de AChE durante a exposição a fumaça de cigarros quanto no período de retirada (figura 20).

Figura 20 - A atividade da AChE durante a exposição, nos períodos curto e longo de retirada



Nota: Não houve diferenças entre os grupos. Valores são médias \pm erros padrão da média. CT, camundongos que foram expostos a ar durante a adolescência (PN30-PN45); AChE, acetilcolinesterase; BaixaNic e AltaNic, camundongos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (PN30-PN45).

Fonte: A autora, 2014.

4 DISCUSSÃO

O uso do tabaco causa danos à saúde devido à exposição a inúmeras substâncias tóxicas (Instituto Nacional de Câncer, 2004). O tabagismo apresenta a maior taxa de dependência entre drogas lícitas e ilícitas (Araújo AJ e cols., 2004) e é ainda identificado como a principal causa de mortalidade evitável, sendo responsável por cerca de 6 milhões de mortes a cada ano e enormes prejuízos para a economia mundial. Se a tendência atual continuar, em 2030 o tabagismo causará cerca de 8 milhões de mortes por ano no mundo (World Health Organization, 2011).

A nicotina é considerada o principal componente psicoativo do tabaco. E embora a maioria dos estudos científicos avalie os efeitos somente da nicotina, existem evidências de que os outros componentes do tabaco que atingem o sistema nervoso central em conjunto com a nicotina também causam alterações na atividade cerebral (Abreu-Villaça e cols., 2010; Bruijnzeel 2012; Rose 2006; Villégier e cols., 2010). Estudos mostram que o início do hábito de fumar ocorre frequentemente durante a adolescência, período no qual alterações neuroadaptativas, hormonais e comportamentais ocorrem (Lopez e cols., 2001). Contudo, apesar do grande número de estudos experimentais descrevendo efeitos da nicotina no cérebro e no comportamento adolescente, há poucos estudos em modelos animais dos efeitos da fumaça de cigarro sobre o comportamento e a neurotoxicidade.

O presente estudo utilizou cigarros contendo alta e baixa concentração de nicotina, visando preencher esta lacuna no conhecimento científico. A caracterização das alterações causadas pelo cigarro pode ser de grande utilidade para esclarecer o adolescente e adulto fumantes sobre os riscos do uso do tabaco. O presente estudo demonstra que a exposição à fumaça de cigarro com diferentes concentrações de nicotina durante a adolescência de camundongos, causa alterações comportamentais e bioquímicas e que várias destas alterações podem se manifestar mesmo longo tempo após o término da exposição.

4.1 Resumo dos resultados (Tabelas 4 e 5)

Durante o período de tratamento, os animais expostos tanto a fumaça de cigarro contendo alta concentração de nicotina quanto aqueles expostos a cigarros com baixa concentração desta substância apresentaram redução no ganho de peso. Contudo, as diferenças não persistiram após o término da exposição.

Nos testes comportamentais utilizados (LCE e CV), não foram observadas alterações nos níveis de ansiedade nos animais expostos a fumaça de cigarros com diferentes concentrações de nicotina, em nenhuma das idades testadas. As alterações comportamentais relacionadas a busca por novidade no CV, variaram em função do tipo de cigarro utilizado, e nas diferentes idades testadas. Camundongos fêmeas e machos expostos aos cigarros com baixa concentração de nicotina apresentaram diminuição da busca por novidade durante a exposição e no período curto de retirada. Distintamente, os animais expostos a cigarros com alta concentração de nicotina apresentaram maior busca por novidades durante a exposição mas, um mês após o término da exposição, identificamos diminuição da busca por novidade em fêmeas. Além das variáveis classicamente avaliadas nos testes LCE e CV, quantificamos comportamentos considerados etológicos. Como detalhado na tabela abaixo, foram identificadas alterações comportamentais associadas a exposição e/ou retirada dos cigarros contendo alta e baixa concentração de nicotina. Para algumas variáveis, os efeitos foram dependentes do sexo e na maioria destes casos, fêmeas foram mais sensíveis que machos.

Neste estudo, verificamos também os efeitos no sistema colinérgico. Para os efeitos na ligação da citisina aos nAChRs durante a exposição a ambos os cigarros, ocorreu uma suprarregulação dos receptores. Enquanto, alguns dias após o término da exposição, as fêmeas do grupo previamente exposto a fumaça de cigarro com baixo teor de nicotina apresentaram infrarregulação de nAChR. Para os efeitos no transportador pré-sináptico de colina ([³H]HC-3 ligação), após o término da exposição, nos períodos curto e longo de retirada, os efeitos foram diferenciados para machos e fêmeas. Para a atividade da CHAT, os efeitos foram restritos a machos e dependentes da idade. E para a atividade da AChE, não houve efeito de tratamento em nenhum dos grupos testados.

Tabela 6 - Resumo dos resultados comportamentais (continua)

<i>Variáveis Clássicas</i>	<i>BaixaNic</i>	<i>AltaNic</i>
<i>Labirinto em cruz elevado</i>		
Ansiedade (%Tempo BA, %Entradas BA)		
PN44	NS	NS
PN49	NS	NS
PN74	NS	NS
Atividade Locomotora (Entrada BF)		
PN44	NS	NS
PN49	NS	NS
PN74	NS	↑
<i>Campo vazado</i>		
Busca por novidade (Nº de orifícios explorados)		
PN45	↓	↑
PN50	↓	NS
PN75	NS	↓ (Fêmeas)
Atividade Locomotora (Cen+Pe)		
PN45	↓	NS
PN50	NS	NS
PN75	NS	NS
<i>Variáveis Etológicas</i>		
<i>Labirinto em cruz elevado</i>		
Atividade vertical		
PN44+PN50+PN75	NS	↑ (Machos)
Auto-limpeza		
PN44	NS	↓ (Fêmeas)
PN49	↓	NS
PN74	NS	NS
Alongamentos para o BA		
PN44	NS	NS
PN49	NS	NS
PN74	↓	NS
Tomada de decisão (Tempo no centro)		
PN44	NS	NS
PN49	NS	NS
PN74	↓	NS
<i>Campo vazado</i>		
Atividade vertical		
PN45	NS	NS
PN50	NS	NS
PN75	NS	NS

 Auto-limpeza

PN45	NS	↓ (Fêmeas)
PN50	NS	↓
PN75	↓ (Fêmeas)	NS

 Alongamentos para o centro

PN45	NS	NS
PN50	NS	NS
PN75	↓ (Fêmeas)	NS

Legenda: NS, Não significativo

Fonte: A autora, 2014.

Tabela 7 - Resumo de resultados do sistema colinérgico cortical

<i>Variáveis analisadas</i>	<i>BaixaNic</i>	<i>AltaNic</i>
Ligação ao nAChR		
PN45	↑	↑
PN50	↓ (Fêmeas)	NS
PN75	NS	NS
Ligação ao transportador pré-sináptico de colina		
PN45	NS	NS
PN50	↑ (Machos)	↑ (Machos)
	↓ (Fêmeas)	↓ (Fêmeas)
PN75	↓ (Machos)	↑ (Fêmeas)
Atividade da CHAT		
PN45	↓ (Machos)	↓ (Machos)
PN50	NS	↑ (Machos)
PN75	NS	NS
Atividade da AChE		
PN45	NS	NS
PN50	NS	NS
PN75	NS	NS

Legenda: NS, Não significativo

Fonte: A autora, 2014.

4.2 Efeitos sobre a massa corporal

Uma grande parte dos efeitos do fumo sobre o peso corporal é mediada pela nicotina. Os seus efeitos incluem aumento de gasto de energia, através de ações simpaticomiméticas, aumento de ações de leptina no hipotálamo para suprimir a ingestão de alimentos e aumento dos níveis de norepinefrina, dopamina, serotonina e de GABA no sistema nervoso central, substâncias químicas que influenciam na supressão alimentar e no aumento da taxa metabólica (Audrain-McGovern & Benowitz, 2011). De acordo com isso, vários estudos demonstram que a massa corporal de fumantes adultos é menor do que a não fumantes (Kendig e cols., 2011). Podemos notar que apesar de adolescentes de ambos os sexos relatarem que começam a fumar e continuam com o hábito para fins de perda de peso (Fulkerson & French, 2003), precisa-se de mais estudos para averiguar se o fumo durante a adolescência exerce influência sobre a massa corporal (Audrain-McGovern & Benowitz, 2011). Nossos resultados indicam que a exposição a fumaça de cigarro contendo alta e baixa concentração de de nicotina durante a adolescência de camundongos causa redução do ganho de massa corporal, o que corrobora com estudos anteriores no qual camundongos adolescentes foram expostos a fumaça de cigarros para pesquisa (Abreu-Villaça e cols., 2010; 2013) e sugere que outros componentes da fumaça de cigarro que não a nicotina podem também afetar a massa corporal. Futuros estudos serão importantes para identificar se os mecanismos que causam esta redução do ganho de massa corporal no adolescente são os mesmos que aqueles descritos para adultos e se outros componentes da fumaça de cigarro estão sendo relevantes.

4.3 Níveis séricos de cotinina

Foi utilizado cigarros para pesquisa produzidos pela Universidade de Kentucky (Garcia e cols., 2012; Rinaldi e cols., 2012), do tipo 2R1F contendo 1,7mg de nicotina por cigarro (Universidade de Kentucky, Grupo AltaNic) e cigarros 4A1 contendo 0,14mg de nicotina por cigarro (Universidade de Kentucky, Grupo BaixaNic). Os nossos resultados indicam que a exposição à fumaça de cigarro contendo alta concentração de nicotina gerou níveis séricos de cotinina que são comparáveis aos encontrados em adolescentes fumantes (Caraballo e cols., 2004, Wood e cols., 2004). Em contrapartida, nos animais do grupo

BaixaNic, os níveis de cotinina estavam abaixo do limite de detecção da técnica, o que sugere que outros componentes da fumaça de cigarro tem papel relevante nos resultados comportamentais e bioquímicos deste grupo experimental, como detalhado nos próximos tópicos.

4.4 Testes comportamentais

Para a análise comportamental utilizamos o Labirinto em Cruz Elevado e o Teste de Campo vazado. O Labirinto em Cruz Elevado é um teste comportamental utilizado para quantificar os níveis de ansiedade em animais experimentais, sendo um dos mais populares testes *in vivo* em uso atualmente (Carobrez & Bertoglio, 2005). Os animais de forma geral evitam as áreas abertas do labirinto, pois são mais aversivas e mostram preferência pelas partes fechadas e protegidas pelas paredes do aparelho (Carobrez & Bertoglio, 2005). O Teste de Campo vazado é um teste amplamente utilizado para avaliar a atividade locomotora (Prut e Belzung, 2003). A medida da ambulação neste teste tem se mostrado uma ferramenta importante em neurociência, sendo muito utilizada como um indicador de comportamento exploratório (Crusio, 2001).

Podemos notar que os resultados obtidos a partir do Teste de Campo vazado e do Labirinto em Cruz Elevado são complexos, pois a avaliação da reatividade emocional em animais é complexa e aberta a múltiplas interpretações (Cryan e cols., 2002; Ramos 2008).

4.4.1 Discussão comportamental

Para a análise comportamental utilizamos o Labirinto em Cruz Elevado e o Teste de Campo Vazado. O Labirinto em Cruz Elevado é um teste comportamental utilizado para quantificar os níveis de ansiedade e de atividade locomotora em animais experimentais, sendo um dos mais populares testes *in vivo* em uso atualmente (Carobrez e Bertoglio, 2005). Os roedores de forma geral evitam as áreas abertas do labirinto, as quais presume-se sejam as mais aversivas e mostram preferência pelas partes fechadas e protegidas pelas paredes do aparelho (Carobrez e Bertoglio, 2005). O Teste de Campo Vazado é um teste amplamente

utilizado para avaliar a busca por novidade e a atividade locomotora em roedores (Prut e Belzung, 2003). A medida da ambulação neste teste tem se mostrado uma ferramenta importante em neurociência, sendo muito utilizada como um indicador de comportamento exploratório (Crusio, 2001).

4.4.2 Labirinto em Cruz Elevado

Efeitos no comportamento associado a ansiedade e atividade locomotora

Estudos com fumantes adultos têm mostrado que uso do tabaco pode reduzir a ansiedade, sendo este efeito normalmente atribuído à nicotina presente nos cigarros (Kassel e Unrod, 2000). Assim, tem sido sugerido que fumantes continuam a fumar a fim de regular seu estado de ansiedade (Gilbert e cols., 1989; Picciotto e cols., 2002). Em contraste, em adolescentes há um aumento dos níveis de ansiedade durante a exposição, além de ser sugerido que a ansiedade possa ser sintoma de retirada da nicotina (Hughes e cols., 2000; Parrot, 2003), podendo estar envolvida como fator para a manutenção do hábito de fumar em humanos (Koob e cols., 1993; Watkins e cols., 2000). Em roedores, tem se mostrado que a nicotina pode ser ansiogênica, ansiolítica ou não causar alterações nos níveis de ansiedade (Broni e cols., 1993; Irvine e cols., 1999, 2001; Ouagazzal e cols., 1999). Em um estudo anterior do nosso laboratório, utilizando um modelo de administração oral de nicotina durante a adolescência de camundongos (entre PN30 e 45), observamos que, após curto período de retirada, a nicotina promoveu aumento da ansiedade apenas em camundongos fêmeas no Labirinto em Cruz Elevado (Abreu-Villaça e cols., 2008). Seguindo este raciocínio, outro estudo recente do nosso laboratório (Naiff, 2014), que tinha como objetivo investigar os efeitos da nicotina por via oral em comportamentos associados a ansiedade e/ou do estresse em camundongos adolescentes (PN30 a PN40), não encontrou alteração no comportamento associado a ansiedade em nenhuma das idades testadas. Apesar do tempo de exposição ser menor do que do presente estudo, os resultados encontrados estão semelhantes aos encontrados no presente estudo. Outro estudo anterior de (Adriani e cols., 2004) em camundongos adolescentes demonstrou que a nicotina por via oral pode aumentar os níveis de ansiedade, no entanto, neste estudo, os ratos foram submetidos a uma baixa concentração de nicotina (Adriani e cols., 2004). No presente trabalho, não observamos efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre as variáveis associadas à ansiedade. Esta ausência de resultado pode

ser explicada pelos outros componentes da fumaça de cigarro estarem interagindo com a nicotina de forma a reduzir seus efeitos. Contudo, uma vez que, como descrito acima, fumar causa alterações nos níveis de ansiedade (Hugles e cols., 2000), esperávamos encontrar alterações em nosso modelo de exposição a fumaça de cigarros. Para o nosso conhecimento, não há estudos anteriores que tenham investigado os efeitos da exposição a fumaça de cigarro em modelo animal durante a adolescência. É possível que o estresse inerente a exposição a fumaça de cigarro comprometa a identificação dos efeitos relacionados a ansiedade. Apesar do fato de que a exposição a fumaça do cigarro, como utilizada no presente estudo, minimizar o estresse físico que teria ocorrido com outros meios de exposição, tais como a retenção do corpo em tubos cilíndricos para administração somente via nasal, ambiente de fumo pode ser estressante quando comparado com o ambiente controle, possivelmente devido aos componentes do cigarro que irritam o trato respiratório. Outra possibilidade é a existência de diferenças na suscetibilidade a alteração da resposta ansiogênica entre as diferentes cepas de camundongos, pois em nosso estudo prévio foram utilizados camundongos da cepa C57BL/6. De fato, tem sido reportado que cepas diferentes podem apresentar diferentes sensibilidades a efeitos ansiogênicos/ansiolíticos no teste do Labirinto em Cruz Elevado (Hogg, 1996).

No presente estudo, não foi observada alteração na atividade locomotora no período de exposição, nem no curto período de retirada. No entanto, no longo período de retirada foi encontrado um aumento da atividade locomotora para o grupo AltaNic. Como dito anteriormente, a atividade locomotora é o somatório de entradas no braço aberto + braços fechados. Como a alteração na atividade poderia influenciar as medidas de ansiedade. Neste estudo, optamos por utilizar o percentual de entradas nos braços abertos.

4.4.3 Campo Vazado

Efeitos sobre a busca por novidades e atividade locomotora

A exposição ao cigarro com alto nível de nicotina provocou aumento no comportamento de busca por novidade no Campo Vazado, o que é consistente com a evidência de que a exposição a nicotina aumenta o comportamento exploratório de roedores (para revisão: DiFranza & Wellman, 2007) . Em contrapartida, o comportamento de busca de novidade reduzido de camundongos expostos à fumaça de cigarro com baixos níveis de nicotina, sugere ou que níveis muito baixos de nicotina provocam efeitos contrários do que

aqueles provocados por altos níveis de nicotina ou que outros componentes da fumaça do cigarro são determinantes para este resultado. Estes animais também apresentaram atividade locomotora reduzida, o que sugere um efeito depressivo geral da exposição. Para o nosso conhecimento, não há estudos anteriores que investigaram os efeitos da exposição a fumaça de cigarro com níveis muito baixos de nicotina sobre a atividade locomotora ou busca por novidades, o que é consistente com o fato de que há um número relativamente pequeno de estudos em modelos animais de exposição à fumaça de cigarro. Em um estudo recente do nosso grupo (Abreu-Villaça e cols., 2013), identificamos redução da atividade locomotora no campo aberto em camundongos expostos à fumaça de cigarro durante a adolescência. Neste estudo, o delineamento experimental gerou níveis de cotinina detectáveis, mas aqueles eram 36-40 % mais baixos do que os encontrados no grupo AltaNic do estudo atual. Baseado no fato de que os níveis mais baixos de exposição à nicotina no grupo BaixaNic no estudo atual (associada com níveis de cotinina indetectáveis) reduziu as medidas de atividade no Campo Vazado, é razoável sugerir que a nicotina mascara um efeito depressivo da fumaça de cigarro. Deste modo, os níveis baixos de nicotina em camundongos BaixaNic permitiu a atividade reduzida provocada pela fumaça de cigarro. Considerando que os efeitos estimulantes de drogas de abuso na atividade locomotora têm sido associados aos seus efeitos de recompensa, e que tanto a exposição a novidade quanto a drogas de abuso ativam substratos neurais que medeiam esses efeitos (Kalivas e cols., 1993; Bardo e cols., 1996; Belin & Deroche - Gamonet, 2012; Covey e cols., 2014), a atividade diminuída identificada no CV pode indicar uma resposta central reduzida a fumaça de cigarro, devido aos seus baixos níveis de nicotina.

Enquanto a atividade reduzida de camundongos BaixaNic foi mantida durante o curto período de abstinência, não houve diferenças entre camundongos AltaNic e CT. Estes resultados distintos novamente indicam que o tipo de cigarro foi determinante para os resultados. A meia-vida da nicotina no sangue de camundongos é de 6 a 7 minutos (Petersen e cols., 1984), portanto, dentro de um período de abstinência de cinco dias, espera-se que toda nicotina absorvida durante a exposição à fumaça de cigarro já tenha sido metabolizada e excretada. Apesar do fato, de que não podemos descartar a possibilidade de que alguns componentes do cigarro ainda estejam presentes neste momento, informações sobre o metabolismo de vários componentes potencialmente neuroativos presentes na fumaça de cigarros indicam que um período de cinco dias é o suficiente para limpar o organismo de todos eles (por exemplo, Acetaldeído: Blakley & Scott, 1984; Acetona: EPA, 2003; Benzeno: Hoffmann e cols., 2001; monóxido de carbono: Watson e cols., 1987). Estes resultados sugerem que a abstinência de curto prazo a nicotina foi o principal contribuinte

para o retorno do comportamento de busca por novidades a níveis basais semelhantes ao CT. Distintamente, a redução persistente do comportamento de busca por novidade em camundongos expostos a BaixaNic, sugere que, na situação em que a nicotina nunca esteve presente em níveis significativos, a privação de outros componentes da fumaça de cigarro desempenha um papel importante no efeito comportamental.

Curiosamente, a longo prazo, houve uma redução no comportamento de busca por novidades somente em fêmeas do grupo AltaNic. Este resultado é consistente com os anteriores que demonstram que as fêmeas são mais suscetíveis a diversos efeitos do tabaco e da nicotina (para revisão: Carroll e cols., 2009; Lynch, 2006). Efeitos tardios da retirada da nicotina foram descritos anteriormente (por exemplo, Adriani e cols., 2004; Irvine e cols., 1999; Kota e cols., 2009) e parecem indicar que a exposição a nicotina é capaz de programar alterações funcionais. O conjunto de resultados compreende a primeira evidência em modelos animais indicando que a exposição à fumaça de cigarro durante a adolescência afeta os resultados comportamentais após a privação de longo prazo.

Nossos resultados indicam que as diferenças entre os compostos inalados durante a exposição à fumaça de cigarro são responsáveis por níveis distintos de busca de novidade, durante a exposição e a retirada. Várias características comportamentais, incluindo busca por novidade, têm sido associados ao uso de drogas (Abreu-Villaça e cols., 2006; Belin & Deroche - Gamonet de 2012; Redolat e cols., 2009), de modo que tem sido sugerido que a exposição a drogas de abuso altera essas características comportamentais e que essas características facilitam experimentação de drogas de abuso e/ou a transição para a dependência de drogas (para revisão: Belin & Deroche - Gamonet, 2012). Os mecanismos de associação não estão estabelecidos: Considerando que tanto a exploração de um novo ambiente e exposição / e uso de drogas de abuso (para revisão: Bardo e cols., 1996; 2004; Belin & Deroche - Gamonet de 2012; Covey e cols., 2014) aumentam os níveis de dopamina no núcleo accumbens de roedores, é possível que estes eventos compartilhem uma via neuroquímica semelhante; no entanto, este traço comportamental também pode ser um marcador de vulnerabilidade para mecanismos neurobiológicos do processo de dependência de drogas (para revisão: Belin & Deroche - Gamonet, 2012).

Tendo em vista o mencionado acima, a associação entre drogas de abuso e de busca por novidade, os nossos resultados sugerem que a nicotina, quando combinada com os outros componentes da fumaça do cigarro aumenta o traço comportamental que, por sua vez, pode facilitar a resposta a uma segunda exposição à droga de abuso. No entanto, este efeito não persiste durante a retirada e ainda diminuiu a longo prazo, sugerindo que esta susceptibilidade

está presente apenas durante o período de exposição. Supondo que diminuição do comportamento de busca por novidade apresenta efeito oposto, a fumaça de cigarro com baixos níveis de nicotina pode proteger o organismo contra os efeitos de uma segunda exposição à droga de abuso ou mesmo reduzir o consumo. Futuros estudos com camundongos expostos à fumaça de cigarro com níveis distintos de nicotina pode esclarecer se os resultados comportamentais são capazes de prever a vulnerabilidade à nicotina e outras drogas de abuso em curto e longo prazo.

4.4.4 Efeitos sobre as variáveis etológicas

A auto-limpeza é um comportamento etológico altamente representado em roedores e tem mostrado ser sensível ao estresse e a fármacos ansiogênicos e ansiolíticos (Kalueff e cols., 2010). Apesar disso, a diminuição da auto-limpeza durante e após a exposição à fumaça de cigarro foi acompanhada por alterações nos níveis de ansiedade. Curiosamente, o aumento dos níveis de dopamina no corpo estriado e no núcleo accumbens, diminui a auto-limpeza no Campo Vazado (de Souza Silva e cols., 2008), sem alterações significativas na ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (Buddenberg e cols., 2008). Assim, sugerimos que o nosso modelo de exposição à fumaça de cigarro leva ao aumento dos níveis de dopamina, o que é consistente com os resultados anteriores de efeitos estimulantes tanto da nicotina (Mansvelter & McGehee, 2002) quando do fumo (Brody e cols., 2009; Takahashi e cols., 2008) na via mesocorticolímbica dopaminérgica. De particular interesse para o nosso estudo, Brody e colaboradores (2009) descobriram que, quando os fumantes fumam um cigarro contendo nicotina, a liberação de dopamina no estriado/núcleo accumbens é maior quando comparado aos fumantes que fumam um cigarro com um nível muito baixo de nicotina (0,05 mg de nicotina), tal como medido durante as sessões de tomografia por emissão de positrões realizadas utilizando infusão de ^{11}C - raclopride. Este resultado indica que a nicotina tem um papel importante na liberação de dopamina, mas não descarta a possibilidade de que outros componentes químicos da fumaça de cigarro interferem com os efeitos da nicotina ou tem efeito próprio. Finalmente, no presente estudo, encontramos somente diminuição da auto-limpeza em fêmeas durante a exposição e no momento do longo período de retirada. Isto poderia ser explicado pelo fato do estrogênio ser um modulador de comportamento da auto-limpeza (Kalueff e cols., 2010). De fato, há evidências de que o estrogênio aumenta a

liberação de dopamina no núcleo accumbens (O'Dell & Torres, 2014), e que as células sensíveis ao estrogênio estão presentes em regiões do cérebro que controlam este comportamento (Kalueff e cols., 2010).

No longo período de retirada ocorreu uma diminuição no alongamento BA do Labirinto em Cruz Elevado e do alongamento CEN no Campo Vazado no grupo BaixaNic sugerindo redução no comportamento de risco (Rodgers e cols., 1997; Rodgers & Dalvi, 1997). Estudos anteriores sugerem que o alongamento BA esta inversamente relacionada aos efeitos clássicos de medidas de ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (% de entrada BA e % de tempo BA) (Rodgers & Johnson, 1995). No entanto, no presente estudo, as reduções no alongamento BA e Alongamento CEN não foram acompanhados por alterações nas medidas clássicas relacionadas com a ansiedade, o que sugere que as alterações no comportamento de avaliação de risco podem ocorrer independentemente dos identificados na ansiedade.

Alterações tardias no Labirinto em Cruz Elevado também incluem aumento do tempo gasto no centro do labirinto. Houve uma diminuição nesta medida para o grupo BaixaNic um mês após o fim da exposição. Há evidências de que o Tempo CEN reflete a tomada de decisão (Rodgers e Johnson, 1995; Rodgers e cols., 1997). A escolha entre as duas alternativas, neste caso, os braços abertos e fechados do labirinto, é considerada uma tarefa cognitiva. Para realizá-lo, o animal recolhe e interpreta as informações do ambiente, e uma decisão é tomada quando há um empenho com uma alternativa em particular (para revisão: Ouro e Shadlen, 2007). A diminuição do tempo gasto no centro do labirinto sugere uma deficiência tardia na tomada de decisão, o que pode estar associado tanto para a coleta insuficiente de dados a partir do ambiente ou ao pobre processamento cognitivo destes dados.

4.5 Medidas Colinérgicas

4.5.1 Efeitos na ligação da citisina aos nAChRs

A suprarregulação de nAChRs ocorre em fumantes (Fowler e cols., 2008; Kalman e cols., 2002; Picciotto, 2003) e em modelos animais de exposição a nicotina (Abreu-Villaça e cols., 2003; Alisson e cols., 2009; Doura e cols., 2008), de forma que estudos de diferentes grupos de pesquisa atribuem esta alteração colinérgica à nicotina presente na fumaça de

cigarro. No presente estudo, observamos um aumento na expressão de nAChR tanto nos animais expostos a fumaça de cigarro contendo alta concentração quanto no grupo exposto a fumaça contendo baixa concentração de nicotina. Apesar de não podermos descartar a possibilidade que a quantidade de nicotina absorvida pelos animais BaixaNic seja suficiente para causar a suprarregulação de nAChR, o fato dos dois grupos experimentais apresentarem similar magnitude de suprarregulação, juntamente ao fato de o grupo BaixaNic ter apresentado níveis não detectáveis de cotinina plasmática, enquanto o grupo AltaNic ter apresentado este metabólito da nicotina em níveis encontrados em fumantes adolescentes (Caraballo e cols., 2004) indicam que a nicotina não é o único responsável por esta suprarregulação. Esta conclusão é relevante devido ao papel atribuído a suprarregulação no desenvolvimento da adição ao cigarro; há estudos que demonstram que a suprarregulação de receptores nicotínicos é um evento necessário para o desenvolvimento da adição (Benowitz, 1992; Dani & Heinemann, 1996; Nuutinen e cols., 2005; Sparks & Pauly, 1999). Assim, nossos resultados sugerem que o consumo de cigarros com baixo teor de nicotina não está associado a redução dos níveis de dependência ao cigarro.

Estudos anteriores demonstram que a exposição a nicotina em ratos e camundongos adolescentes causa aumento da expressão de receptores de nAChR de forma persistente na fase adulta (Abreu-Villaça e cols., 2003; Doura e cols., 2008; Flores e cols., 1992; Miao e cols., 1998; Nuutinen e cols., 2005; Trauth e cols., 1999). Nossos resultados mostram que em nosso modelo experimental, a suprarregulação não persistiu após alguns dias do término da exposição a fumaça de cigarro. Não temos conhecimento de outros estudos que investiguem a dinâmica de mudanças na expressão ou atividade de nAChRs em animais adolescentes expostos à fumaça de cigarros. A divergência entre resultados obtidos com roedores adolescentes expostos a nicotina (Engle e cols., 2012) quando comparados aos nossos camundongos adolescentes expostos a fumaça sugere que a exposição prévia a outros componentes de fumaça de cigarro interfere com os eventos celulares e moleculares que influenciam a expressão destes receptores (Holladay e cols., 1997; Allison e cols., 2009). Alguns dias após o término da exposição identificamos a infrarregulação dos nAChRs somente em fêmeas do grupo BaixaNic. Este resultado indica que a exposição prévia a fumaça de cigarros com baixos níveis de nicotina modifica a expressão dos nAChR durante uma retirada de curto prazo, o que supora a hipótese que componentes da fumaça que não a nicotina afetam o sistema colinérgico central. Interessantemente, este efeito foi identificado somente em fêmeas. Um estudo com humanos, que pesquisou diferenças na expressão de receptores nicotínicos em homens e mulheres por meio de exame de imagem após alguns dias

de cessação do ato de fumar, observou-se que mulheres apresentavam uma diminuição na expressão destes receptores quando comparado a homens (Cosgrove e cols., 2012). Nenhum dos efeitos foi persistente a longo prazo, o que está de acordo com achados prévios que mostram que a expressão de receptores nicotínicos volta a níveis normais após o término da exposição a nicotina (Happe & Murrin, 1992; Trauth e cols; 1999, 2000, 2001) ou fumaça de cigarro (Abreu-Villaça, 2003; Mamede e cols., 2007).

4.5.2 Efeitos na ligação do[3H]HC-3 ao transportador pré-sináptico de colina

A ligação do HC-3 ao transportador pré-sináptico de colina é responsiva a atividade colinérgica, então, quanto maior a atividade, maior a ligação do HC-3 ao transportador, e reduções no HC-3 podem envolver perda de terminais sinápticos colinérgicos ou reduções na atividade neuronal (Simon e cols., 1976; Klemm & Kuhar, 1979).

A exposição a fumaça de cigarro não foi capaz de gerar alterações durante o período de exposição com nenhuma das concentrações de nicotina presente na fumaça de cigarro utilizada no presente estudo. Após um curto período de abstinência foi observado redução da marcação do HC-3 nas fêmeas dos grupos BaixaNic e AltaNic, resultado que está de acordo com trabalhos anteriores que demonstram que a nicotina induz redução do HC-3 após a interrupção do tratamento (Abreu-Villaça e cols., 2003) mas diverge dos resultados de Ribeiro-Carvalho e colaboradores (2009), onde a nicotina não causou alterações significativas da ligação ao HC-3. Porém, em machos foi observado aumento da marcação do HC-3.

Após um longo período de abstinência ocorreu uma diminuição da marcação ao HC-3 em machos do grupo AltaNic e em fêmeas foi observado um aumento nesta marcação. Resultados divergentes entre nosso estudo e estudos anteriores pode ser resultado de diferentes rotas de administração. Estudos anteriores utilizaram vias de administração diferentes, como minibombas osmóticas (que produzem níveis plasmáticos de nicotina constantes), injeções (controla-se o tempo entre a última exposição e o momento do sacrifício), ou via oral de nicotina (que a solução de nicotina fica a disposição do animal).

De acordo com Trauth 2000, as alterações no HC-3 dependem da idade e região tratada. Neste trabalho, foram utilizados ratos de ambos os sexos, com início do tratamento em PN30 com duração de 17 dias, e realizado administração de nicotina através de um adesivo transdermico, com o objetivo de avaliar as alterações no sistema colinérgico em áreas

cerebrais envolvidas na adição. No córtex cerebral, ao final do período de exposição não foi observado nenhuma alteração. Resultado similar ao encontrado em nosso estudo. Em outro estudo, animais tratados por nicotina em minibombas, em um período de exposição de PN2 a PN19, foi observada redução da ligação do HC-3 ao transportador pré-sináptico de colina em PN15. Após um curto período de retirada (3 dias) não houve diferenças entre os grupos. Porém, após um longo período de retirada (PN90) um aumento na expressão do HC-3 ocorreu. Nossos resultados para o longo período de retirada estão consistentes com estes dados encontrados (Nunes-Freitas e cols., 2011). Outro trabalho que utilizou exposição a fumaça de cigarro com concentração de nicotina alta e baixa em camundongos adolescentes, teve como resultado aumento da captação de colina em ambos os grupos tratados em comparação ao grupo controle (Abreu-Villaça e cols., 2010). Uma possível explicação para os resultados encontrados neste trabalho e no presente estudo serem diferentes, pode ser pela exposição ter sido mais intensa no estudo de 2010, o que gerou também níveis de cotinina mais altos.

4.5.3 Efeitos na atividade da CHAT

Durante a exposição, a fumaça de cigarro com alta e baixa concentração de nicotina promoveu efeitos sexo-dependentes. Foi encontrada uma diminuição da atividade da CHAT somente em machos durante a exposição a ambos os tipos de cigarros e, durante o curto período de retirada houve um aumento da atividade da CHAT em machos somente no grupo AltaNic. Considerando que a CHAT é um marcador constitutivo da sinapse colinérgica (Aubert e cols., 1996; Navarro e cols., 1989; Happe & Murrin, 1992; Zahalka e cols., 1992, 1993) a redução da CHAT indica perda da inervação colinérgica, podendo refletir em morte de neurônios (Trauth e cols., 2000). Desta forma, podemos sugerir que durante a exposição machos foram mais sensíveis aos efeitos a fumaça do cigarro. E o aumento encontrado em machos no curto período de retirada somente no grupo AltaNic, sugere que somente a fumaça de cigarro com alto teor de nicotina promove um aumento significativo da inervação colinérgica, podendo representar uma resposta compensatória ao dano celular, como podemos constatar em vários trabalhos que estudam os efeitos da exposição a nicotina (Abreu-Villaça e cols., 2003, 2004; Nunes-Freitas e cols., 2011). A ausência de alterações no longo prazo sugere que, com o término da exposição, há recuperação, de forma que a densidade de

sinapses colinérgicas volta aos níveis encontrados em animais controle.

4.5.4 Efeitos na atividade da AChE

Estudos demonstram que a atividade da AChE pode estar alterada dependendo do tipo de tratamento, do tempo de exposição, e da idade estudada Nunes-Freitas e colaboradores (2011) infundiram nicotina por minibombas em ratos fêmeas lactantes Durante o período de exposição (PN21) e no longo período de retirada (PN90) não foi observado alteração na atividade da AChE. Porém em outras idades estudadas foi observado alteração na atividade desta enzima, como em PN30 que houve um aumento da atividade da AChE no mesencéfalo da prole. Porém, quando foi observado na idade de PN30, no hipocampo, foi observado uma diminuição desta atividade. No presente estudo, observamos que a atividade da AChE não se mostrou alterada em nenhum dos grupos testados, nem durante a exposição, no curto e longo período de retirada. De acordo com essa idéia, sugerimos que a atividade desta enzima não tem papel relevante nos efeitos da exposição a fumaça de cigarro, nos modelos animais utilizados neste estudo.

CONCLUSÃO

Efeitos sobre a cotinina:

A cotinina plasmática dos camundongos AltaNic foi semelhante a de fumantes. Camundongos CT e BaixaNic apresentaram níveis de cotinina sérica não detectáveis, ou seja, semelhantes aos encontrados em não-fumantes

Efeitos sobre a performance comportamental:

Não obtivemos efeitos sobre os níveis de ansiedade em nenhuma das idades e tipo de cigarros testados.

A busca por novidade foi diminuída nos camundongos expostos a BaixaNic em PN45 e PN50, porém esse efeito não foi persistente para PN75. Para o grupo AltaNic, foi observado um aumento da busca por novidade em PN45, efeito não persistente para PN50. Em PN75 foi observada uma diminuição somente em fêmeas. Sugerindo uma correlação hormonal. A partir destes resultados concluímos que o tipo de cigarro utilizado determinou o comportamento de busca por novidades, o que sugere que a nicotina tem papel relevante na determinação deste comportamento mas que outros componentes da fumaça de cigarro, também tem papel.

Para a atividade locomotora, foi observado no EPM, hiperatividade somente no grupo AltaNic para o longo período de abstinência. E no CV, foi observada somente hipoatividade durante o Período de exposição.

Efeitos sobre o sistema colinérgico:

Os nAChRs apresentaram uma supregulação em PN45 nos grupos AltaNic e BaixaNic, o que indica que outros componentes da fumaça de cigarro que não a nicotina afetam o sistema colinérgico do camundongo adolescente.

A ligação ao transportador pré-sináptico de colina não apresentou efeito significativo em PN45 nos grupos testados. Em PN50, ocorreu supregulação nos machos e infrarregulação nas fêmeas dos grupos AltaNic e BaixaNic.

A atividade da CHAT foi diminuída em machos de PN45 de ambos os grupos experimentais quando comparado ao grupo controle. No curto período de retirada foi observado aumento desta atividade somente para machos. Efeitos não persistentes para um longo período de abstinência. O que sugere uma recuperação da densidade das sinapses.

A atividade da AChE, os efeitos não foram significativos em nenhuma das idades e grupos testados. Sugerimos que a atividade desta enzima não tem papel relevante nos efeitos da exposição a fumaça de cigarro.

REFERENCIAS

1. Abreu-villaça Y, Cavina CC, Ribeiro-Carvalho A, et al. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol during adolescence leads to short- and long-term modulation of anxiety-like behavior. *Drug Alcohol Depend.* 2013 Nov 1;133(1):52-60.
2. Abreu-Villaça Y, De Carvalho Graça AC, et al. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nicotine Tob Res.* 2013; 15(7):1211-21. doi: 10.1093/ntr/nts250.
3. Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Guthierrez M, et al. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine & Tobacco Research Advance.* 2010.
4. Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhães AC. Developmental aspects of the Cholinergic System. *Behav. Brain Res* 2010. Review.
5. Abreu-Villaça Y, Medeiros AH, Lima CS, et al. Combined Exposure to Nicotine and Ethanol in Adolescent Mice Differentially Affects Memory and Learning during Exposure and Withdrawal. *Behav Brain Res,* 2007; 181: 136-146.
6. Abreu-Villaça Y, Nunes F, Queiroz-Gomes FE, et al. Combined Exposure to Nicotine and Ethanol in Adolescent Mice Differentially Affects Anxiety Levels during Exposure, Short Term and Long Term Withdrawal. *Neuropsychopharmacology,* 2008; 33: 599-610.
7. Abreu-Villaça Y, QUEIROZ-GOMES FDO E, DAL MONTE AP, et al. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.* 2006 Feb 15;167(1):175-82. Epub 2005 Oct 7.
8. Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes FE, Dal Monte AP, et al. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57Bl/6 mice. *Behav Brain Res,* 2006; 167: 175-182.
9. Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Qiao D, et al. Shortterm adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Neuropsychopharmacology,* 2003a; 28: 1935-1949.
10. Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Slotkin TA. Impact of adolescent nicotine exposure on adenylyl cyclase-mediated cell signaling: enzyme induction, neurotransmitter-specific effects, regional selectivities, and the role of withdrawal. *Brain Res.* 2003b; 988: 164-172.

11. Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Tate CA, et al. Does Prenatal Nicotine Exposure Sensitize the Brain to Nicotine-Induced Neurotoxicity in Adolescence? *Neuropsychopharmacology*, 2004b; 29: 1440-1450.
12. Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes F DoE, Dal Monte AP, et al. Individual differences in novelty-seeking behaviour but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 2006;167:175 – 82
13. Abreu-Villaça Y. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience*, 2009; 162:1174:1186.
14. Adriani W, Granstrem O, Macri S, et al. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29(5):869-78.
15. Adriani W, Macri S, Pacific R, et al Peculiar vulnerability to nicotine oral self administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology*, 2002; 27: 212-224.
16. Andersson C, Wennström P, Gry J. Nicotine alkaloids in Solanaceous food plants. *TemaNord*, 2003; 531, 1–37.
17. Anthenelli, RA. Recent advances in the treatment of tobacco dependence. *CLINICAL NEUROSCIENCE RESEARCH* 5(2-4): 175-183 DOI: 10.1016/j.cnr.2005.08.014
18. Araújo AJ, Menezes AMB, Dórea AJPS, et al. Diretrizes para cessação do tabagismo. *J Bras Pneumol* 2004; 30 Suppl 2:S1-76.
19. Araújo JA. Diretrizes para Cessação do Tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2004; 30 (Supl 2).
20. Aricioglu F, Altunbas H. ANN N Y Harmane induces anxiolysis and antidepressant-like effects in rats. *Acad Sci*. 2003 Dec;1009:196-201.
21. Audrain-McGovern, J. & Benowitz, NL. Cigarette smoking, nicotine, and body weight. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2011, 90, 164-168. doi: 10.1038/clpt.2011.105
22. Balerio GN, Aso E, Maldonado R. Role of the cannabinoid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006 Mar;184(3-4):504-13. Epub 2006 Jan 14.
23. Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res*. 1996 May; 77(1-2):23-43. Review.
24. Bardo MT, Dwoskin LP. Biological connection between novelty- and drug-seeking motivational systems. *Nebr Symp Motiv*. 2004; 50:127-58. Review. No abstract available.

25. Bartecchi CE, Mackenzie TD, Schier RW. The Global Tobacco Epidemic. *Scientific American*, May, 1995.
26. Baumrind DA. Developmental perspective on adolescent risk taking in contemporary America. In: IRWIN, C.E., Jr. (Eds.) *Adolescent Social Behavior and Health*, San Francisco, CA: Jossey-Bass, 1987, pp. 93-125.
27. Bayer SA, Yackel. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 1982; 216: 890-892.
28. Belin D, Deroche-Gamonet V. Responses to novelty and vulnerability to cocaine addiction: contribution of a multi-symptomatic animal model. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(11). pii: a011940. doi: 10.1101/cshperspect.a011940.
29. Belluzzi JD, Lee AG, Oliff HS, et al. Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology*, 2004, 174:389-95.
30. Benowitz NL, Porchet H, Sheiner L, et al. Nicotine absorption and cardiovascular effects with smokeless tobacco use: Comparison with cigarettes and nicotine gum. *Clin Pharmacol Ther*, 1988; 44: 23-28.
31. Benowitz NL. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med Clin North Am*. 1992, 76: 415-437
32. Biala G, Budzynska B. Effects of acute and chronic nicotine on elevated plus maze in mice: involvement of calcium channels. *Life Sci*. 2006 May 30;79(1):81-8. Epub 2006 Feb 3.
33. Biala G, Kruk M. Cannabinoid receptor ligands suppress memory-related effects of nicotine in the elevated plus maze test in mice. *Behav Brain Res*. 2008 Oct 10; 192(2):198-202. doi: 10.1016/j.bbr.2008.04.004. Epub 2008 Apr 16.
34. Blakley PM, Scott WJ JR. Determination of the proximate teratogen of the mouse fetal alcohol syndrome. 2. Pharmacokinetics of the placental transfer of ethanol and acetaldehyde. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984; 72(2):364-71.
35. Blier P, DE Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci*. 1994 Jul;15(7):220-6. Review.
36. Bobo JK, Husten C. Sociocultural Influences on Smoking and Drinking. *Alcohol Research & Health*, 2000; 24(4): 225-232.
37. Boissier JR, Simon P. [The exploration reaction in the mouse. Preliminary note]. *Therapie*. 1962 Nov-Dec;17:1225-32. French. No abstract available.
38. Breloa, N. Psychiatric comorbidity of smoking and nicotine dependence. *Behav. Genet*. 1995, 25, 95-101.

39. Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJ, et al. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *Eur.J.Pharmacol.*, 1993; 238: 1-8.
40. Brody AL, Mandelkern MA, Olmstead RE, et al. Ventral striatal dopamine release in response to smoking a regular vs a denicotinized cigarette. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34(2):282-9. doi: 10.1038/npp.2008.87.
41. Bruijnzeel AW. Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012, 36(5):1418-41.
42. Buddenberg TE, Topic B, Mahlberg ED, et al. Behavioral actions of intranasal application of dopamine: effects on forced swimming, elevated plus-maze and open field parameters. *Neuropsychobiology*. 2008;57(1-2):70-9. doi: 10.1159/000135640.
43. Buisson B, Bertrand D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends in pharmacological sciences*, 2002; 23:130-6.
44. Bush, P.G., Mayhew, T.M., Abramovich, D.R., et al. Quantitative study on the effects of maternal smoking on placental morphology and cadmium concentration. *Placenta* 2000, 21, 247 – 256.
45. Cao J, Belluzzi JD, Loughlin SE, et al. Acetaldehyde, a major constituent of tobacco smoke, enhances behavioral, endocrine, and neuronal responses to nicotine in adolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology*, 2007, 32: 2025-35.
46. Carlson, Neil R. *Physiology of Behavior* (9th ed.). Boston: Pearson Education, Inc. 2007, p. 117. ISBN 0-205-46724-5.
47. Carroll, M.E., Anker, J.J., Perry, J.L. Modeling risk factors for nicotine and other drug abuse in the preclinical laboratory. *Drug Alcohol Depend*. 2009, 104 Suppl 1, S70-S708.
48. Casey BJ, Tottenham N, Liston C, et al. Imaging the developing brain: What have we learned about cognitive development? *Trends Cogn Sci*, 2005; 9: 104–110.
49. Cheeta S, Irvine EE, Tucci S, et al. In adolescence, female rats are more sensitive to the anxiolytic effect of nicotine than are male rats. *Neuropsychopharmacology*, 2001; 25: 601-607.
50. Chen J, Millar WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep* 1998;9:39-46.
51. Chistyakov V, Patkina N, Tammimäki A, et al. Nicotine exposure throughout early development promotes nicotine self-administration in adolescent mice and induces long-lasting behavioural changes. *Eur J Pharmacol*. 2010 Aug 25;640(1-3):87-93. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.04.044. Epub 2010 May 8.
52. Comings, D.E.; Muhleman, D.; Gysin, R. Dopamine D2 receptor (DRD2) gene and susceptibility to posttraumatic stress disorder: A study and replication. *Biol. Psychiatry*. 1996, 40, 368-372.

53. Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40:431-58. Review.
54. Cosgrove KP, Esterlis I, McKee SA, et al. Sex differences in availability of $\beta 2^*$ -nicotinic acetylcholine receptors in recently abstinent tobacco smokers. *Arch Gen Psychiatry*. 2012 Apr; 69(4):418-27. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.1465.
55. Covey DP, Roitman MF, Garris PA. Illicit dopamine transients: Reconciling actions of abused drugs. *Trends Neurosci*. 2014 pii: S0166-2236(14)00016-2. doi: 10.1016/j.tins.2014.02.002. [Epub ahead of print]
56. Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; 49(1):171-6.
57. Cunningham MG, Bhattacharyya S, Benes FM. Amygdalocortical sprouting continues into early adulthood: implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. *J Comp Neurol.*, 2002; 453: 116-130.
58. Dackis C, O'Brien C. Neurobiology of addiction: Treatment and public policy ramifications. *Nat Neurosci*, 2005; 8:1431-40.
59. Dahl RE. Adolescent brain development: A period of vulnerabilities and opportunities. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1021: 1-22.
60. Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007; 47: 699-729
61. Dani JA, Heinemann S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*. 1996, 16: 905-908
62. Dazzi L, Seu E, Cherchi G, et al. Estrous Cycle-Dependent Changes in Basal and Ethanol-Induced Activity of Cortical Dopaminergic Neurons in the Rat. *Neuropsychopharmacology*, 2007; 32: 892-901.
63. de Souza Silva MA, Topic B, Huston JP, et al. Intranasal dopamine application increases dopaminergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens and enhances motor activity in the open field. *Synapse*. 2008 Mar;62(3):176-84.
64. Degenhardt, L.; Hall, W. The relationship between tobacco use, substance-use disorders and mental health: Results from the national survey of mental health and well-being. *Nicotine Tob. Res*. 2001, 3, 225-234.
65. Dellu-Hagedorn F. Relationship between impulsivity, hyperactivity and working memory: a differential analysis in the rat. *Behav Brain Funct*. 2006 Mar 28;2:10.
66. Difranza JR, Savageau JA, Rigotti NA, et al Trait anxiety and nicotine dependence in adolescents: a report from the DANDY study. *Addict Behav*, 2004; 29: 911-919.

67. DiFranza JR, Wellman RJ. A sensitization–homeostasis model of nicotine craving, withdrawal, and tolerance: Integrating the clinical and basic science literature. *Nicotine Tob Res*, 2005; 7: 9–26.
68. DiFranza JR1, Wellman RJ. Sensitization to nicotine: how the animal literature might inform future human research. *Nicotine Tob Res*. 2007; 9(1):9-20.
69. Dunsby J, Bero L. A nicotine delivery device without the nicotine? Tobacco industry development of low nicotine cigarettes. *Tobacco Control*, 2004;13:362-369.
70. Dunsby J, Bero L. A nicotine delivery device without the nicotine? Tobacco industry development of low nicotine cigarettes. *Tobacco Control*, 2004, 13, 362-369.
71. Durcan MJ, Lister RG. Does directed exploration influence locomotor activity in a holeboard test? *Behav Neural Biol*. 1989 Jan; 51(1):121-5.
72. Durston S, Hulshoff Pol HE, Casey BJ, et al. Anatomical MRI of the developing human brain: what have we learned? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2001; 40: 1012-1020.
73. Elders MJ, Perry CL, Eriksen MP, et al. The report of the Surgeon General: preventing tobacco use among young people. *Am J Public Health* 1994; 84(4): 543-547.
74. Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, et al. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Heinemann S. Cell*. 1994 Nov 18;79(4):705-15.
75. Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, et al. alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Mar 13;98(6):3501-6. Epub 2001 Mar
76. Elliott BM, Faraday MM, Phillips JM, et al. Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004, 77:21–28.
77. Engle SE, Broderick HJ, Drenan RM. J Local application of drugs to study nicotinic acetylcholine receptor function in mouse brain slices. *Vis Exp*. 2012 Oct 29;(68):e50034. doi: 10.3791/50034. PMID: 23128482 [PubMed - indexed for MEDLINE]
78. EPA - U.S. Environmental Protection Agency. Toxicological review of acetone (CAS No. 67-64-1). In support of summary information on the integrated risk information system (IRIS). EPA/635/R-03/004. 2003. Available at: <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0128tr.pdf>. Accessed: May 2nd, 2014.
79. Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Gil L, et al. Inbred Roman High- and low-avoidance rats: Differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiol Behav* 1999; 67: 19-26.

80. Falk L, Nordberg A, Seiger A, et al. Smoking during early pregnancy affects the expression pattern of both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors in human first trimester brainstem and cerebellum. *Neuroscience*, 2005; 132: 389–97
81. Farzin D, Mansouri N. Antidepressant-like effect of harmaline and other beta-carbolines in the mouse forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006 Jul;16(5):324-8. Epub 2005 Sep 22.
82. Fenster CP, Whitworth TL, Sheffield EB; et al. Upregulation of surface alpha4beta2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *The journal of neuroscience*, 1999; 19:4804-14.
83. Ferandes C, File SE. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated-plus maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996; 54: 31-40.
84. File SE, Cheeta S, Irvine EE, et al. Conditioned anxiety to nicotine. *Psychopharmacology*; 2002; 164: 309-17.
85. File SE, Kenny PJ, Ouagazzal AM. Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. *Behav Neurosci*. 1998 Dec;112(6):1423-9.
86. File SE, Wardill AG. The reliability of the hole-board apparatus. *Psychopharmacologia*. 1975 Oct 14;44(1):47-51.
87. File SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*. 2001 Nov 1;125(1-2):151-7. Review.
88. Filgueiras CC, Ribeiro-Carvalho A, Nunes F, et al. Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009; 93(2):148-54.
89. Fisher LB, Miles IW, Austin SB, et al. Predictors of Initiation of Alcohol Use Among US Adolescents Findings From a Prospective Cohort Study. *Arch Pediatr Adolesc Med.*, 2007; 161(10): 959-966.
90. Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, et al. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of a4 and b2 subunits and is upregulated by chronic nicotine treatment. *Mol. Pharmacol.*, 1992; 41, 31–37.
91. Fowler CD, Arends MA, Kenny PJ. Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: Evidence from genetically modified mice. *Behavioural Pharmacology*, 2008;19:461-484.
92. Fraga MC, Moura EG, Silva JO, et al. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 100:165 – 73.

94. Fraga-Marques MC, Moura EG, Claudio-Neto S, et al. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. *Horm Behav.*, 2009 Feb;55(2):272-9. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.11.010. Epub 2008 Dec 11.
95. Galduróz JCF, Noto AR, Fonseca AM, et al. Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras. Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas – CEBRID/UNIFESP, 2004.
96. Galvão JF, Moreau RLM. Fundamentos de toxicologia – parte 4: Toxicologia social e medicamentos, 4.7. Tabaco. Seizi Oga, 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003; 297-306.
97. Gilbert DG, Robinson JH, Chamberlin CL, et al. Effects of smoking/nicotine on anxiety, heart rate, and lateralization of EEG during a stressful movie. *Psychophysiology*, 1989; 26, 311-320.
98. Gilbert, D. Smoking: Individual Differences, psychopathology and emotion; Taylor & Francis: Washington, DC, USA, 1995.
99. Gold JI, Shadlen MN, The neural basis of decision making. *Annu. Rev. Neurosci.* 2007; 30, 535-574.
100. Grant BF, Dawson DA. Age at onset of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse and dependence: Results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Subst Abuse*, 1997; 9:103–10.
101. Grucza RA, Bierut LJ. Cigarette smoking and the risk for alcohol use disorders among adolescent drinkers. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 Dec; 30(12):2046-54.
102. Hoebel BG, Monaco AP, Hernandez L, et al. Self-injection of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology*, 1983; 81: 158-63.
103. Hoffmann D, Hoffmann I. The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health.* 1997; 50(4):307-64.
104. Hoffmann MJ, Sinko PJ, Lee YH, et al. Pharmacokinetic studies in Tg.AC and FVB mice administered [¹⁴C] benzene either by oral gavage or intradermal injection. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001; 174(2):139-45.
105. Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996; 54: 21-30.
106. Hughes JR, Stead LF, Lancaster T. Anxiolytics for smoking cessation. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 4. 2000, p. CD002849
107. Ikemoto S, Wise RA. Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology*, 2004; 47: 190-201.

108. Instituto Nacional de Câncer. Prevalência de tabagismo no Brasil: dados dos inquéritos epidemiológicos em capitais brasileiras. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância, Instituto Nacional de Câncer; 2004.
109. Irvine EE, Cheeta S, File SE. Time-course of changes in the social interaction test of anxiety following acute and chronic administration of nicotine. *Behav Pharmacol.* 1999; 10(6-7):691-7.
110. Irvine L, Crombie IK, Wright A, et al. Does passive smoking increase the frequency of health service contacts in children with asthma? *Thorax.* 2001 Jan;56(1):9-12.
111. Jacobsen LK, Krystal JH, Mencl WE, et al. Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco. *Biological Psychiatry,* 2005;57: 56-66.
112. Jacobsen LK, Mencl WE, Constable RT, et al. Impact of smoking abstinence on working memory neurocircuitry in adolescent daily tobacco smokers. *Psychopharmacology (Berl),* 2007; 193(4): 557-66.
113. Jain KK. Modulators of nicotinic acetylcholine receptors as analgesics. *Curr. Opin. Investig. Drugs,* 2004; 5: 76-81.
114. Jamal M, Ameno K, Wang W, et al. Inhibition of acetaldehyde metabolism decreases acetylcholine release in medial frontal cortex of freely moving rats. *Brain Research,* 2005. 1039, 90-96.
115. Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG, et al. Monitoring the future national survey results on drug use, 1975–2011: Volume II, college students and adults ages 19–50, Ann Arbor, MI Institute for Social Research, The University of Michigan. 2012; Retrieved from www.monitoringthefuture.org/pubs/monographs/mtf-vol2_2011.pdf
116. Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG et al. Monitoring the future national survey results on drug use, 1975–2004: Volume I, secondary school students. In Book *Monitoring the future national survey results on drug use, 1975–2004: Volume I, secondary school students, vol. 1.* Bethesda, MD: National Institutes of Health; 2005. Retrieved from www.monitoringthefuture.org/pubs/monographs/vol1_2004.pdf
117. Kalivas PW, Sorg BA, Hooks MS. The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav. Pharmacol.* 1993; 4, 315-334.
118. Kassel JD, Unrod MJ. Smoking, anxiety, and attention: support for the role of nicotine in attentionally mediated anxiolysis. *Abnorm Psychol.* 2000 Feb; 109(1):161-6.
119. Katner SN, Davis SA, Kirsten AJ, et al. Effects of nicotine and mecamylamine on cognition in rhesus monkeys. *Psychopharmacology,* 2004; 175: 225-240.
120. Kliethermes CL, Kamens HM, Crabbe JC. Drug reward and intake in lines of mice selectively bred for divergent exploration of a hole board apparatus. *Genes Brain Behav.* 2007 Oct; 6(7):608-18.
121. Kodaira K, Fujishiro K, Wada T, et al. A study on cerebral nicotine receptor distribution, blood flow, oxygen consumption, and other metabolic activities – a study

- on the effects of smoking on carotid and cerebral artery blood flow. *Yakubutsu Seishin Kodo*, 1993; 13: 157-165.
122. Koshibu K, Levitt P, Ahrens ET. Sex-specific, postpuberty changes in mouse brain structures revealed by threedimensional magnetic resonance microscopy. *Neuroimage*, 2004; 22: 1636-1645.
 123. Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, et al. Risk-Taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev*, 2003; 27: 19-31.
 124. Laviolette, S. R. e D. Van DerkooyER. "The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour." *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5(1): 55-65.
 125. Lebargy F. *Biologia da Nicotina*. In Yves Martinet & Abraham Bohadana (Eds.), *O Tabagismo – Da prevenção à abstinência*, 2003; 91-96. Lisboa: Climepsi.
 126. Levin ED, Lawrence S, Petro A, et al. Increased nicotine selfadministration following prenatal exposure in female rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006; 85: 669-674.
 127. Lindstrom J, Anand R, Gerzanich V, et al. Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog Brain Res.* 1996;109:125-37. Review. No abstract available.
 128. Little HJ. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol research & health: The journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 2000; 24:215-24.
 129. Lopez MF, White NM, Randall CL. Alcohol tolerance and nicotine cross-tolerance in adolescent mice. *Addict Biol.*, 2001, 6: 119-127.
 130. Lucas ACS, Parente RCP, Pianço NS, et al. Use of psychoactive drugs by health sciences undergraduate students at the Federal University in Amazonas, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 2006; 22(3): 663-671.
 131. Lynch WJ, Sofuoglu M. Role of progesterone in nicotine addiction: evidence from initiation to relapse. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2010; 18(6):451-61.
 132. Mallett KA, Lee CM, Neighbors C, et al Do we learn from our mistakes? An examination of the impact of negative alcohol-related consequences on college students' drinking patterns and perceptions. *Journal of Studies on Alcohol*, 2006; 26(2): 269-276.
 133. Mamede M, Ishizu K, Ueda M, et al. Temporal change in human nicotinic acetylcholine receptor after smoking cessation: 5IA SPECT study. *Nucl Med.* 2007 Nov;48(11):1829-35. Epub 2007 Oct 17.
 134. Manhães AC, Guthierrez MC, Filgueiras CC, et al. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.* 2008 Nov 21;193(2):216-24. doi: 10.1016/j.bbr.2008.05.018. Epub 2008 Jun 3.

135. Mansvelder HD, McGehee DS. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol.* 2002; 53(4):606-17.
136. McClave, A.K.; McKnight-Eily, L.R.; Davis, S.P.; et al. Smoking characteristics of adults with selected lifetime mental illnesses: Results from the 2007 National health interview survey. *Am. J. Public Health* 2010, 100, 2464-2472.
137. McGehee DS, Role LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons.. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57:521-46. Review.
138. McGehee ds. Nicotine and Synaptic Plasticity in Prefrontal Cortex. *Sci STKE*, 2007; 399: 1-2.
139. Mcwilliams, J. R. AND G. Lynch. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science*, 1983; 221: 572-574.
140. Miao H, Liu C, Bishop K, Gong ZH, et al. Nicotine exposure during a critical period of development leads to persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. *J Neurochem.* 1998 Feb;70(2):752-62.
141. Morissette SB, Tull MT, Gulliver SB, et al. Anxiety, anxiety disorders, tobacco use, and nicotine: a critical review of interrelationships. *Psychology Bulletin*, 2007; 133:245-72.
142. Navarro, H.A., Seidler, F.J., Schwartz, R.D., et al. Prenatal exposure to nicotine impairs nervous system development at a dose which does not affect viability or growth. *Brain Res. Bull.* 1989, 23, 187 – 192.
143. Neurobiology of grooming behavior. Editors Allan V. Kalueff, Justin L. Laporte and Carisa L. Bergner. 2010. Cambridge University Press, New York
144. NIDA - National Institute on Drug Abuse, Tobacco Addiction, NIH Publication number 12-4342, Washington, DC. 2012. Available at: <http://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/tobacconicotine>. Accessed: May 2nd, 2014.
145. Nuutinen s, Ahtee I, Tuominen RK Time and brain region specific up-regulation of low affinity neuronal nicotinic receptors during chronic nicotine administration in mice * Division of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, P.O. Box 56 (Viikinkaari 5 E), University of Helsinki, FIN-00014, Finland Received 11 November 2004; received in revised form 18 January 2005; accepted 2 February 2005 Available online 13 May 2005
146. O'Dell LE, Torres OV. A mechanistic hypothesis of the factors that enhance vulnerability to nicotine use in females. *Neuropharmacology.* 2014; 76 Pt B:566-80. doi: 10.1016/j.neuropharm. 2013.04.055.

147. Olincy, A.; Young, D.A.; Freedman, R. Increased levels of the nicotine metabolite cotinine in schizophrenic smokers compared to other smokers. *Biol. Psychiatr.* 1997, 42, 1-5.
148. Oliveira-da-Silva A, Manhães AC, Cristina-Rodrigues F, et al. Hippocampal increased cell death and decreased cell density elicited by nicotine and/or ethanol during adolescence are reversed during drug withdrawal. *Neuroscience*, 2010; 167:163-13.
149. Oliveira-da-Silva A, Vieira FB, Cristina-Rodrigues F, et al. Increase apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *International Journal of Developmental NEUROSCIENCE*, 2009. 27, 539-548.
150. Ouagazzal AM, Kenny PJ, File SE. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated- plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology*, 1999; 144: 54-60.
151. Overstreet DH. Differential effects of nicotine in inbred and selectively bred rodents. *Behavior Genetics*, 1995, 25, 179-185.
152. Ozer EM, Adams SH, Gardner LR, et al. Provider self-efficacy and the screening of adolescents for risky health behaviors. *J Adolesc Health*, 2004; 35: 101–107.
153. Parrott AC, Murphy RS. Explaining the stress-inducing effects of nicotine to cigarette smokers. *Hum Psychopharmacol.* 2012 Mar;27(2):150-5. doi: 10.1002/hup.1247.
154. Parrott AC. Cigarette-derived nicotine is not a medicine. *World J. Biol. Psychiatry.* 2003; 4, 49-55.
155. Pelloux Y, Costentin J, Duterte-Boucher D. Novelty preference predicts place preference conditioning to morphine and its oral consumption in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006 May;84(1):43-50. Epub 2006 Jun 2.
156. Pesquisa Especial de Tabagismo (PETab) – Relatório Brasil. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Organização Pan-Americana da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 199p.
157. Petersen DR, Norris KJ, Thompson JA. A comparative study of the disposition of nicotine and its metabolites in three inbred strains of mice. *Drug Metab Dispos.* 1984; 12(6):725-31.
158. Petersen, A.C., Silbereisen, R.K. And Soerenson, S. Adolescent development: A global perspective. In: Hurrelmann, K. and Hamilton, S.F. (Eds.) *Social Problems and Social Contexts in adolescence: Perspectives Across Boundaries*, Hawthorne, NY: Aldine de Gruyter, 1996. pp. 3-37.
159. Peterson, A.L.; Vander Weg, M.W.; Jean, C.R. *Nicotine and tobacco dependence*; Hogrefe Publishing: Cambridge, MA, USA, 2011; pp. 5-7.

160. Piazza PV, Deminière JM, Le Moal M, et al. Factors that predict Individual Vulnerability to Amphetamine self-administration. *Science*. 1989; 245 (4925): 1511-3.
161. Piazza PV, Fardico M, Russo D, et al. Circling behavior: ethological analysis and functional considerations. *Behav Brain Res*. 1989 Jan 1;31(3):267-71.
162. Picciotto MR, Bruzell DH, Caldarone BJ. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, 2002; 13: 1097-1106.
163. Pickworth WB, Fant RV, Nelson RA, et al. Pharmacodynamic effects of new denicotinized cigarettes. *Nicotine Tob Res*. 1999;1(4):357-64.
164. Pilon SC, O'Brien B, Piedra, KAC. The relationship between drugs use and risk behaviours in brazilian university students. *Rev Latino-am Enfermagem* 2005 novembro-dezembro; 13(número especial): 1169-76.
165. Placzek AN, Zhang TA, Dani Ja. Age dependent nicotinic influences over dopamine neuron synaptic plasticity. *Biochem Pharmacol*, 2009; 78:686–92.
166. Pormealeu, OF; Downey, KK; Stelson, FW; et al. Cigarette smoking in adult patients diagnosed with attention deficit hyperactivity disorder. *J.Subst. Abuse*. 1995, 7, 373-378.
167. Pratt, LA; Brody DJ. Depression and smoking in the U.S. household population aged 20 and over, 2005 – 2008. *NCHS DATA BRIEFS* 2010, 34, 1-8.
168. Prokhorov AV, Winickoff JP, Ahluwalia JS et al. Tobacco Consortium, American Academy of Pediatrics Center for Child Health Research. Youth tobacco use: A global perspective for child health care clinicians. *Pediatrics*, 2006; 118, e890–e903.
169. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 2003; 463:3–33
170. Redolat R, Pérez-Martínez A, Carrasco MC, et al. Individual differences in novelty-seeking and behavioral responses to nicotine: a review of animal studies. *Curr Drug Abuse Rev*. 2009 Sep;2(3):230-42.
171. Resnick MD, Bearman PS, Blum RW, et al. Protecting adolescents from harm. Findings from the National Longitudinal Study on Adolescent Health. *JAMA*, 1997; 278: 823–832.
172. Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Filgueiras CC, et al. Nicotine and ethanol interact during adolescence: effects on the central cholinergic systems. *Brain Res*. 2008 Sep 26;1232:48-60.
173. Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Medeiros AH, et al. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 228-36.
174. Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Medeiros AH, et al. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience* , 2009; 162(4): 1174-1186.

175. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30(3):289-304.
176. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997; 21(6): 801-810.
177. Rodgers RJ, Johnson NJ, Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995; 52, 297-303.
178. Rose JE. Nicotine and non nicotine factors in cigarette addiction. *Psychopharmacology*, 2006; 184, 274-285.
179. Rosemberg J, Miranda MA, Rosemberg AMA. Nicotina - Droga Universal. São Paulo (BR): Instituto Nacional de câncer (INCA); 2004. Disponível online: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/nicotina.pdf>
180. Rucktooa P; Smit AB; Sixma TK. Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures. *Biochem. Pharmacol.* 2009, 78, 777-787.
181. Salas R, Pieri F, Fung B, et al. Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the $\beta 4$ subunit of the nicotinic receptor. *J Neurosci*, 2003; 23: 6255-6263.
182. Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1993;16:403-43. Review.
183. Slotkin TA, Pinkerton KE, Garofolo MC, et al. Perinatal exposure to environmental tobacco smoke induces adenylyl cyclase and alters receptor-mediated cell signaling in brain and heart of neonatal rats. *Brain Research*, 2001; 898: 73-81.
184. Slotkin TA, Ryde IT, Wrench N, et al. Nonenzymatic role of acetylcholinesterase in neuritic sprouting: regional changes in acetylcholinesterase and choline acetyltransferase after neonatal 6-hydroxydopamine lesions. *Neurotoxicol Teratol* 2009; 31: 183-6.
185. Slotkin TA. If nicotine is a developmental neurotoxicant in animal studies, dare we recommend nicotine replacement therapy in pregnant women and adolescents? *Neurotoxicology and Teratology*, 2008;30:1-19.
186. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. 6th edn., Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1967.
187. Sowell ER, Peterson BS, Thompson PM, et al. Mapping cortical change across the human life span. *Nat Neurosci*, 2003; 6: 309–315.
188. Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000; 24: 417-463.

189. Steinberg L, Fletcher A, Darling N. Parental monitoring and peer influences on adolescent substance use. *Pediatrics* 1994; 93: 1060-72.
190. Summers KL, Kem WR, Giacobini E. Nicotinic agonist modulation of neurotransmitter levels in the rat frontoparietal cortex. *Japanese journal of Pharmacology* 1997; 74,139-146.
191. Svensson CK. Clinical pharmacokinetics of nicotine. *Clin Pharmacokin*, 1987; 12, 30-40.
192. Takahashi H, Fujimura Y, Hayashi M, et al. Enhanced dopamine release by nicotine in cigarette smokers: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2008; 11:413–417.
193. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, et al. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, 1999, 19: 5792-5801.
194. Tassonyi E, Charpentier E, Muller D, et al. The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Res Bull*. 2002 Jan 15;57(2):133-50. Review.
195. Tavares BF, Béria JU, Lima MS. Factors associated with drug use among adolescent students in southern Brazil. *Rev Saúde Pública*, 2004; 38(6): 1-9.
196. Taylor RM, Pearce S, Gibson F, et al. Developing a conceptual model of teenage and young adult experiences of cancer through meta-synthesis. *Int J Nurs Stud*. 2013 Jun;50(6):832-46.
197. Terborg C, Birkner T, Schack B, et al. Acute effects of cigarette smoking on cerebral oxygenation and hemodynamics: a combined study with near- infrared spectroscopy and transcranial Doppler sonography. *J Neurol Sci*, 2002; 205: 71-75.
198. Thanos P, Delis F, Rosko L, et al. Passive Response to Stress in Adolescent Female and Adult Male Mice after Intermittent Nicotine Exposure in Adolescence. *J Addict Res Ther*. 2013 Apr 23;Suppl 6:007.
199. The National Center on Addiction and Substance Abuse (CASA) at Columbia University CASA analysis of the Youth Risk Behavior Survey (YRBS), 2009, Atlanta, GA: US. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, 2011.
200. Tizabi, Y., Popke, E.J., Rahman, M.A., et al. Hyperactivity induced by prenatal nicotine exposure is associated with an increase in cortical nicotinic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1997, 58, 141 – 146.
201. Trauth JA, Mccook, Seidler FJ, et al. Modeling adolescent nicotine exposure: effects on cholinergic systems in rat brain regions. *Brain Research*, 2000a; 873: 18-25.

202. Trauth JA, Seidler FJ, Slotkin TA. An animal model of adolescent nicotine exposure: effects on gene expression and macromolecular constituents in rat brain regions. *Brain Research*, 2000; 867, 29-39. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02208-3.
203. Trauth, J. A., F. J. Seidler, Et al. Adolescent nicotine exposure produces immediate and long-term changes in CNS noradrenergic and dopaminergic function. *Brain Res.* 2001; 892: 269-280.
204. Tutka p, Mosiewicz j, Wielosz m. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacological Reports*, 2005; 57: 143-153.
205. UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. The health consequences of smoking: A report of the surgeon general; U.S. Department of health and human services, Centers for Disease control and prevention, national centre for cronic disease prevention and health promotion, office on Smoking and health: Washington, DC, USA, 2004.
206. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res*, 21 (2002), pp. 49–57.
207. Vaglenova J, Birru S, Pandiella NM, et al. An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. *Behav Brain Res* 2004; 150: 159-70.
208. Van Leijenhorst L, Gunther MB, Op de Macks ZA, et al. Adolescent risky decision-making: Neurocognitive development of reward and control regions. *Neuroimage* 2010; 51: 345-55.
209. Vastola, BJ.; Douglas, LA.; Varlinskaya EI.; et al. Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rats. *Physiol Behav*, 2002, v. 77, p. 107-114.
210. Vigitel. ACT br. Aliança de controle do tabagismo.
<http://www.slideshare.net/MinSaude/apresentao-i-vigitel-2011>
211. Villégier AS, Gallager B, Heston J, et al. Age influences the effects of nicotine and monoamine oxidase inhibition on mood-related behaviors in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010, 208(4):593-601.
212. Volkow ND, Chandler RK, Fletcher BW. Drug addiction as a brain disorder or disease [reply]. *JAMA*, 2009; 301:1881–2.
213. Volkow ND, Li TK. Drugs and alcohol: treating and preventive abuse, addiction and their medical consequences. *Pharmacology and therapeutics*, 2005; 108: 3-17.

214. Walker N, Bullen C, McRobbie H. Reduced-nicotine content cigarettes: Is there potential to aid smoking cessation? *Nicotine & Tobacco Research* 2009;11:1274-1279.
215. Watson ES, Jones AB, Ashfaq MK, et al. Spectrophotometric evaluation of carboxyhemoglobin in blood of mice after exposure to marijuana or tobacco smoke in a modified Walton horizontal smoke exposure machine. *J Anal Toxicol.* 1987; 11(1):19-23.
216. WHO - World Health Organization. report on the global tobacco epidemic, 2011: Warning about the dangers of tobacco, Geneva, Switzerland WHO Press. 2011; Retrieved from http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240687813_eng.pdf
217. Wills TA, Vaccaro D, McNamara G. Novelty seeking, risk taking and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse* 1994; 6: 1-20.
218. Wills TA, Vaccaro D, McNamara G. Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse.* 1994; 6 (1):1-20.
219. Wise, RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6: 243-51
220. Yamamoto Y, Nishiyama Y, Monden T, et al. A study of the acute effects of smoking on cerebral blood flow using ^{99m}Tc-ECD SPET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2003; 30: 612-614.
221. Zvolensky, M.J.; Forsyth, J.P.; Fuse, T.; et al. Smoking and non-clinical panic attacks: An initial empirical test of panic-relevant cognitive processes. *Cogn. Behav. Ther.* 2002, 31, 170-182.