



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

Juliana de Oliveira Silva

Os efeitos locomotores e exploratórios da infusão contínua de nicotina em camundongos Suíços adolescentes são modulados de forma sexo- e idade-dependente pela exposição ao Ambiente Enriquecido na infância

Rio de Janeiro

2017

Juliana de Oliveira Silva

**Os efeitos locomotores e exploratórios da infusão contínua de nicotina em camundongos
Suíços adolescentes são modulados de forma sexo- e idade-dependente pela exposição ao
Ambiente Enriquecido na infância**

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

Orientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Coorientadora: Prof^a Dra. Mabel Carneiro Fraga Simões

Rio de Janeiro

2017

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

S586 Silva, Juliana de Oliveira.
Os efeitos locomotores e exploratórios da infusão contínua de nicotina em camundongos Suiços adolescentes são modulados de forma sexo – e idade – dependente pela exposição ao Ambiente Enriquecido na infância / Juliana de Oliveira Silva. – 2017.
100 f.

Orientador: Alex Christian Manhães.
Coorientadora: Mabel Carneiro Fraga Simões.

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

1. Nicotina – Teses. 2. Atividade Motora – Efeitos de drogas. 3. Neurotransmissores. 4. Tabaco – Efeitos adversos. I. Manhães, Alex Christian. II. Simões, Mabel Carneiro Fraga. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 613.84

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Juliana de Oliveira Silva

**Os efeitos locomotores e exploratórios da infusão contínua de nicotina em camundongos
Suíços adolescentes são modulados de forma sexo- e idade-dependente pela exposição ao
Ambiente Enriquecido na infância**

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

Aprovada em 31 de março de 2017.

Coorientadora: _____

Prof^a Dra. Mabel Carneiro Fraga Simões
Universidade Redentor

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Alex Christian Manhães (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof^a. Dra. Elaine de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

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

Prof^a. Dra. Regina Celia Cussa Kubrusly
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Alex, agradeço pela oportunidade de entrar no laboratório logo no início da graduação, pela orientação, confiança e apoio todos esses anos.

À minha co-orientadora Mabel que me inseriu na vida científica e me ensinou coisas que foram muito além dos testes comportamentais. Obrigada pela amizade.

À Yael pelo grande exemplo de competência e dedicação à pesquisa, ao Claudio por todas as discussões de seminários, projetos que com certeza contribuíram na minha formação e por fazer dos nossos almoços os mais engraçados.

Ao Ulisses e Jemima pela colaboração no projeto. Ao Sylvio pela colaboração no projeto e por ter me ensinado como tratar os animais, como testar, como contar, não tinha pessoa melhor no laboratório pra me ensinar tudo isso, obrigada pela amizade.

Aos colegas do laboratório de Neurofisiologia, em especial minhas amigas queridas: Anna Caroline, Ana Carolina e Juliana, sem vocês teria sido bem mais difícil chegar até aqui. Muito obrigada pela amizade, pela parceria, por compartilharem de tantos momentos comigo, eu amo vocês!

Aos amigos da graduação, Anatalia, Flávia e Luíza, pela amizade de sempre e por estarem presentes, ainda que de longe.

Ao meu grande amigo Thiago, minha amizade de ouro, obrigada por estar sempre perto, por ser uns dos meus maiores incentivadores, por acreditar mais em mim do que eu mesma, por todas as conversas, resumos emprestados...obrigada por tudo! Estou pra sempre na sua torcida, você é o melhor!

À minha melhor amiga, Laila, por estar sempre presente e aguentar minhas reclamações desde o fim do mestrado. Obrigada por sempre acreditar em mim, me incentivar, dar força e viagens rs sempre que necessário. Eu amo você.

À minha igreja Sara Nossa Terra-Anil e aos meus colaterais pela amizade, amor e parceria.

À minha grande amiga e "orientadora de vida", Elaine por tantas coisas que não caberiam aqui rs...obrigada por me ajudar a crescer, por estar junto nos muitos momentos de crises, por acreditar em mim e compartilhar preciosidades comigo. Você é meu referencial em tudo! Te amo!

À minha família, pela base e compreensão durante todos esses anos.

À Deus, de onde vem tudo o que eu tenho, tudo o que sou e tudo que eu vier a ser.

A nossa vida depende de como administramos os ambientes em que estamos inseridos. Não há vida de excelência sem um ambiente propício a isso. Tudo na vida passa pelo ambiente.

Robson Rodvalho

RESUMO

SILVA, Juliana de Oliveira. *Os efeitos locomotores e exploratórios da infusão contínua de nicotina em camundongos Suíços adolescentes são modulados de forma sexo- e idade-dependente pela exposição ao Ambiente Enriquecido na infância*. 2017. 100 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O enriquecimento ambiental (AE) consiste em um modelo experimental no qual os animais são expostos a um ambiente que fornece uma variedade de estímulos cognitivos, sensoriais e motores. Pesquisas em ratos mostraram que o AE pode estimular a neurogênese, no hipocampo por exemplo, ao longo de toda a vida. Essas modificações estruturais resultam em aprimoramento da função cognitiva, que pode ser observada através da melhora em tarefas envolvendo memória e aprendizagem. O AE traz também benefícios comportamentais na modulação do humor e no contato social. A exposição ao AE durante o desenvolvimento pode ter impacto sobre as respostas neurofisiológicas às drogas de abuso devido à sua ação sobre o sistema de recompensa do cérebro. Estudos tem proposto que o AE é uma nova possibilidade na abordagem neurocomportamental de diferentes alterações na função do sistema nervoso central, particularmente em relação ao seu papel tanto na prevenção como na reversão dos efeitos da dependência a diferentes drogas de abuso. De fato, atribui-se ao AE um papel protetor contra o desenvolvimento desta dependência. No presente estudo, nosso objetivo foi o de avaliar, em camundongos Suíços, o impacto da exposição prévia ao AE na infância sobre os efeitos derivados do tratamento com nicotina durante a adolescência em parâmetros comportamentais relacionados à atividade locomotora, à busca por novos estímulos e à ansiedade, bem como sobre o conteúdo cerebral de dopamina, DOPAC e noradrenalina, em dois momentos do desenvolvimento do animal, na adolescência, no 45^o dia de vida pós-natal (PN) e na idade adulta (PN75). Para tanto, de PN15 a PN30 (infância), as ninhadas experimentais foram separadas em dois grupos: as expostas ao AE e as expostas ao ambiente controle (CONT). De PN30 a PN45 (adolescência), os animais foram tratados com nicotina (NIC; minibomba osmótica s.c.) ou salina (SAL). Formaram-se, então, 4 grupos experimentais: CONT-SAL, CONT-NIC, AE-SAL e AE-NIC. Os animais foram avaliados, em PN45 (adolescentes) ou em PN75 (adultos), inicialmente no campo aberto (CA) e, 2 h, depois, no campo vazado (CV). No CA, a exposição ao AE aumentou a atividade locomotora das fêmeas adolescentes. Na idade adulta, os machos tratados com nicotina também apresentaram um aumento na atividade locomotora. No CV, a exposição ao AE reverteu os efeitos da nicotina sobre o número de orifícios explorados tanto nas fêmeas como nos machos adultos. A exposição ao AE reduziu a concentração de dopamina no córtex dos machos adultos, enquanto que o conteúdo de DOPAC foi reduzido nos machos adultos expostos ao AE e tratados com nicotina. Além disso a exposição ao AE aumentou a concentração de noradrenalina cortical tanto em fêmeas como em machos adultos. Nossos resultados indicam a clara influência da exposição ao ambiente enriquecido no comportamento dos animais, podendo modular ou até mesmo reverter efeitos causados pelo tratamento com a nicotina de forma sexo-dependente.

Palavras-chaves: Ambiente enriquecido. Nicotina. Atividade locomotora. Busca pela novidade. Neurotransmissores.

ABSTRACT

SILVA, Juliana de Oliveira. *The locomotor and exploratory effects of continuous infusion of nicotine in adolescent mice are modulated in sex dependent on exposure the enriched environment in childhood*. 2017. 100 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Environmental enrichment (EE) consists of an experimental model in which animals are exposed to an environment that provides a variety of cognitive, sensory and motor stimuli. Research in mice has shown that the EE can stimulate neurogenesis, for example in the hippocampus, throughout life. These structural changes result in improved cognitive function, which is observed, for example, through improvements in tasks involving memory and learning. The EE also has behavioral benefits regarding the modulation of mood and social contact. EE exposure during development can have an impact on the neurophysiological responses to drugs of abuse due to its action on the reward system of the brain. Studies have suggested that EE is a new possibility of neurocomportamental approach to changes in the function of the central nervous system, particularly in relation to its role both in prevention and in the reversal of the effects of addiction to various drugs of abuse. In fact, the EE has been assigned a protective role regarding the development of this dependency. Here, our goal was to evaluate, in adolescent (postnatal day - PN - 45) and adult (PN75) Swiss mice, the impact of prior exposure to the enriched environment during childhood on the effects derived from treatment with nicotine during adolescence on the following behavioral parameters: locomotor activity, search for new stimuli and anxiety. Also studied were the contents of dopamine, DOPAC and norepinephrine. From PN15 to PN30 (childhood), experimental litters were separated into two groups: those exposed to the EE and those exposed to the control environment (CONT). From PN30 to PN45 (adolescence), animals were either treated with nicotine (NIC; osmotic minipumps s.c.) or saline (SAL). Four experimental groups were thus used: CONT-SAL, CONT-NIC, EE-SAL and EE-NIC. The animals were evaluated, at PN45 (adolescence) or at PN75 (adulthood), initially in the open field (CA) and, 2 hours later, in the hole board arena (CV). In the CA, EE exposure increased locomotor activity of adolescent females. At adulthood, males treated with nicotine also showed an increase in locomotor activity. In the CV, EE exposure reversed the effects of nicotine on the number of explored holes both in adult females and males. EE exposure reduced the concentration of dopamine in the cortex of adult males, while the content of DOPAC was reduced in adult males exposed to EE and treated with nicotine. Besides, EE exposure increased the concentration of cortical noradrenaline in both adult females and males. Our results indicate a clear influence of the enriched environment exposure on animal behavior, modulating or even reversing the effects of subsequent nicotine in a sex-dependent manner.

Keywords: Enriched Environment. Nicotine. Locomotor activity. Novelty. Neurotransmitters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Vias Dopaminérgicas.....	28
Figura 2 -	Foto em vista superior-oblíqua da gaiola Ambiente Enriquecido.....	33
Figura 3 -	Foto em vista superior-oblíqua da gaiola padrão para camundongos.....	34
Figura 4 -	Foto em vista superior do Campo Aberto.....	36
Figura 5 -	Foto em vista superior do Campo Vazado.....	37
Figura 6 -	Desenho experimental.....	40
Figura 7 -	Evolução da massa corporal: Progenitoras.....	43
Figura 8 -	Evolução da massa corporal: Proles.....	44
Figura 9 -	Campo Aberto: Efeitos da exposição.....	50
Figura 10 -	Campo Aberto: Efeitos do Tratamento.....	51
Figura 11 -	Campo Aberto: Entradas Totais.....	52
Figura 12 -	Campo Aberto: Entradas no Centro e na Periferia.....	53
Figura 13 -	Campo Aberto: Percentual de Entradas no Centro e Tempo no Centro.....	54
Figura 14 -	Campo Aberto: Autolimpeza e Levantamentos.....	55
Figura 15 -	Campo Vazado: Efeitos da exposição e do tratamento no número de orifícios explorados.....	60
Figura 16 -	Campo Vazado: Orifícios Explorados - Total.....	61
Figura 17 -	Campo Vazado: Orifícios Explorados - Centro e Borda.....	62
Figura 18 -	Campo Vazado: Tempo no Centro e Borda.....	63
Figura 19 -	Campo Vazado: Autolimpeza e Levantamento.....	64
Figura 20 -	Concentração de Dopamina: Córtex.....	67
Figura 21 -	Concentração de DOPAC: Córtex.....	68
Figura 22 -	Razão DOPAC/Dopamina: Córtex.....	69
Figura 23 -	Concentração de Noradrenalina: Córtex.....	70

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis do Campo Aberto...49
- Quadro 2 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis do Campo Vazado..59
- Quadro 3 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis neuroquímicas..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5 HT1A	Receptor de serotonina
5HIAA	Ácido 5-hidroxi-indol-acético
AE	Ambiente enriquecido
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
ANOVA _r	Análise de variância com medidas repetidas
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	Campo aberto
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CONT	Grupo controle
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
CV	Campo Vazado
D1	Receptor de dopamina
D2	Receptor de dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DCF	Departamento de ciências fisiológicas
EPM	Erro padrão da média
F	Razão de Fischer
FPLSD	Diferença mínima significativa protegida de Fisher
GL	Grau de liberdade
GDS	Godelieve Deny'stroyf
HPA	Hipotalâmico-pituitário-adrenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IBRAG	Instituto de Biologia Alberto Alcantara Gomes
K-S	Kolmogorov-Smirnov
LN	Laboratório de neurofisiologia
NA	Núcleo accumbens
nAChR	Receptor colinérgico nicotínico
NE	Noradrenalina
NIC	Nicotina
P	Valor de prova

PN	Dia de vida pós-natal
SAL	Salina
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TDAH	Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	REVISÃO DA LITERATURA.....	13
1	OBJETIVOS.....	31
1.1	Objetivos específicos.....	31
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1	Animais e grupos experimentais.....	32
2.2	Exposição ao Ambiente Enriquecido.....	33
2.3	Tratamento com nicotina.....	34
2.4	Desenvolvimento somático dos animais.....	35
2.5	Testes comportamentais.....	35
2.5.1	<u>Teste do Campo Aberto.....</u>	35
2.5.2	<u>Teste do Campo Vazado.....</u>	37
2.6	Análise neuroquímica.....	38
2.7	Quantificação da cotinina plasmática.....	39
2.8	Desenho global do experimento.....	40
2.9	Análise quantitativa.....	40
2.9.1	<u>Aspectos preliminares.....</u>	40
2.9.2	<u>Análise da evolução da massa corporal.....</u>	41
2.9.3	<u>Parâmetros comportamentais.....</u>	41
2.9.4	<u>Parâmetros neuroquímicos.....</u>	41
2.9.5	<u>Aspectos complementares.....</u>	41
3	RESULTADOS.....	43
3.1	Massa Corporal.....	43
3.1.1	<u>Progenitoras.....</u>	43
3.1.2	<u>Filhotes.....</u>	44
3.2	Testes comportamentais.....	45
3.2.1	<u>Campo Aberto.....</u>	45
3.2.1.1	Entradas Totais.....	45
3.2.1.2	Entradas Centro.....	46
3.2.1.3	Entradas Borda.....	46
3.2.1.4	% Entradas Centro.....	47
3.2.1.5	Tempo Centro.....	47
3.2.1.6	Autolimpezas.....	48

3.2.1.7	Levantamentos.....	48
3.2.1.8	Correlações entre os dados do campo aberto.....	49
3.2.2	<u>Campo Vazado</u>	56
3.2.2.1	Orifícios Totais.....	56
3.2.2.2	Orifícios Centro.....	57
3.2.2.3	Orifícios Borda.....	57
3.2.2.4	Tempo Centro e Tempo Borda.....	58
3.2.2.5	Autolimpezas.....	58
3.2.2.6	Levantamentos.....	58
3.2.2.7	Correlações entre os dados do campo vazado.....	59
3.3	Análise Neuroquímica	64
3.3.1	<u>Dopamina</u>	65
3.3.2	<u>DOPAC</u>	65
3.3.3	<u>Razão DOPAC/Dopamina</u>	65
3.3.4	<u>Noradrenalina</u>	66
3.3.5	<u>Correlação entre os dados neuroquímicos</u>	66
4	DISCUSSÃO	71
4.1	Via de administração, doses e idades	71
4.2	Massa corporal	72
4.3	Testes comportamentais	74
4.3.1	<u>Campo aberto</u>	74
4.3.2	<u>Campo vazado</u>	76
4.4	Avaliação neuroquímica	78
4.4.1	<u>Dopamina e DOPAC</u>	78
4.4.2	<u>Noradrenalina</u>	79
4.5	Considerações gerais	80
	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82

REVISÃO DA LITERATURA

AMBIENTE ENRIQUECIDO

Histórico

Uma característica intrigante do cérebro humano é a sua capacidade de modificação estrutural e funcional em resposta a estímulos externos. Os antecedentes históricos das ideias sobre mudanças cerebrais em relação a diferentes experiências podem ser traçados voltando-se à Grécia antiga e capturando a imaginação de cientistas, filósofos e escritores (Rosenzweig, 1996). A hipótese de que as alterações morfológicas ocorrem no cérebro como consequência da experiência é antiga: foi no século 18 que se supôs que o tecido nervoso poderia responder ao exercício através do seu crescimento físico. Em 1874, por exemplo, Charles Darwin, na sua descrição em coelhos selvagens, observou que o cérebro desses animais apresentava um tamanho aumentado em relação aos dos coelhos domesticados e concluiu que os animais domesticados não desenvolviam seu intelecto, instintos e os sentidos tanto quanto faziam aqueles de ambiente selvagem (Diamond, 2001). Desta forma, infere-se que o ambiente natural dos animais oferece uma riqueza maior de experiências do que o doméstico. Destas observações iniciais, e de muitas que se seguiram, desenvolveu-se o conceito de Ambiente Enriquecido (AE). Modernamente, considera-se que o AE consiste em uma rica experiência sensorio-motora (Kohl et al., 2002), podendo ser composto de estimulação sensorial passiva e ativa (Nithianantharajah e Hannan, 2006; Redolat e Mesa-Gresa, 2012; Fares et al., 2013), aumento do contato social e adição de novos estímulos (Renner e Rosenzweig, 1987; Pamplona et al., 2009).

Estudos epidemiológicos sugerem que o AE tem relevância clínica direta em uma variedade de distúrbios neurológicos e psiquiátricos, como por exemplo nas doenças de Huntington, Alzheimer e Parkinson (Hannan, 2014). Um recente estudo em humanos demonstrou o impacto do AE sobre a função cognitiva, sugerindo que o AE melhora a aprendizagem e diminui o risco de demência na velhice. Exames de imagem mostraram que níveis mais elevados de educação associados à exposição a um ambiente enriquecido parecem aumentar a espessura cortical e a conectividade cerebral, resultado de uma maior interação

nas redes neurais corticais e subcorticais. Isso se dá devido a característica do AE despertar uma maior estimulação através das diferentes tarefas oferecidas, o que exige um alto nível das funções executivas e, conseqüentemente, um aumento da plasticidade neuronal. Portanto, não necessariamente o AE melhora o nível da habilidade cognitiva geral, mas sim, um conjunto abrangente de processos neurais, o que poderia, em seguida, agir como um bom recurso contra o declínio cognitivo na velhice, funcionando como um mecanismo neuroprotetor. No entanto, estudos em seres humanos revelam que as escolhas do estilo de vida, tais como diferentes práticas de movimento, também funcionam como AE, podendo influenciar positivamente sobre mecanismos cerebrais relacionados à autopercepção (Bushnell et al., 2015).

Em seres humanos, o AE é utilizado por profissionais de diferentes áreas de atuação, como fisioterapeutas, psicomotricistas, educadores físicos e fonoaudiólogos, através de métodos como o de Cadeias musculares e articulares Godelieve Deny'stroyf (GDS), o de Béziers e o de Treinamento Funcional, dentre outros, para promover o desenvolvimento afetivo e cognitivo (Silva et al., 2006). O método GDS, por exemplo, na forma de tratamento em grupo, usa um conjunto de abordagens psicocomportamentais associados a movimentos envolvendo circuitos e a adição de novos estímulos (como bolas, diferentes texturas, pranchas de equilíbrio, elásticos, túnel, etc.). Para Godelieve Denys-Struyf, o método de cadeias musculares e articulares GDS envolve diferentes aspectos como a leitura da postura, do gesto e das formas do corpo, estratégias de cuidados terapêuticos, de modelagem, de ajustamento osteoarticular e de regularização das tensões musculares, bem como a conscientização, a ginástica (o movimento) para a melhor utilização psicocorporal. Como acima citado, AE consiste em rica experiência sensorio-motora, incentivo na realização de exercícios físicos, aumento do contato social e adição de novos estímulos. Considerando estes aspectos, é possível afirmar que o método de cadeias musculares GDS pode ser claramente considerado como uma possível aplicação prática do AE em humanos. O método GDS é assim usado como uma ferramenta para promover a adaptabilidade, como estratégia de eleição terapêutica sozinha ou combinada, com tratamentos farmacológicos por exemplo, com o objetivo de potencializar o efeito destes, promovendo o aumento do contato social, funcionando como um ajustador dos sistemas neurocomportamentais envolvidos na aprendizagem, sendo benéfico para doenças neurodegenerativas e perturbações psiquiátricas, uma vez que aumenta a plasticidade neuronal, induz modificações morfológicas, neurobiológicas, fisiológicas, comportamentais, maior neurogênese e mudanças na estrutura sináptica, se apresentando como um mecanismo de neuroproteção para o desenvolvimento humano (Santos, 2015).

Ambiente Enriquecido em modelos experimentais

O enriquecimento ambiental usado experimentalmente consiste em um modelo no qual os animais são expostos a um ambiente que fornece uma variedade de estímulos cognitivos, sensoriais e motores (Renner e Rosenzweig, 1987; van Praag et al., 2000) que normalmente não estariam presentes nas condições ambientais normais (controle) dos sujeitos. O paradigma do enriquecimento ambiental foi primeiramente descrito em um contexto neurocientífico no final da década de 40 por Donald Olding Hebb, quando o neurocientista levou para sua própria casa um grupo de ratos de laboratório para serem tratados como "animais de estimação". Esse grupo tinha um ambiente amplo para explorar, enquanto outro grupo de ratos foi mantido em gaiolas em laboratórios. Ao testar os dois grupos em tarefas de labirintos, foi observado que o grupo de ratos criados em sua casa obteve um melhor desempenho quando comparado ao grupo de ratos criados em laboratório, sugerindo que o enriquecimento no início do desenvolvimento traria benefícios que se prolongariam até a maturidade (Hebb, 1947). Desde então, muitos trabalhos foram publicados mostrando os benefícios desse paradigma no comportamento dos animais.

O ambiente enriquecido pode ser dividido em dois tipos: o enriquecimento físico e o social. As estratégias de enriquecimento físico envolvem modificações estruturais, incluindo um espaço maior e a inclusão de características que permitem o exercício, exploração e que permitem aos animais, ainda, algum controle sobre o seu ambiente (Stewart e Bayne, 2004). Embora a natureza dos protocolos utilizados varie bastante entre os trabalhos, o ambiente fisicamente enriquecido é normalmente constituído de gaiolas grandes, contendo uma variedade de objetos: escadas, túneis, esconderijos, brinquedos e uma roda de correr. Esses objetos fornecem uma gama de oportunidades de estímulos visuais, somatossensoriais, olfativos e motores, com maiores possibilidades de interação, manipulação, exploração do ambiente, além dos benefícios da atividade física voluntária. Adicionalmente, a localização dos objetos e da ração pode ser frequentemente trocada de lugar dentro da gaiola, o que favorece a aprendizagem espacial através da criação de novos mapas espaciais (van Praag et al., 2000). O enriquecimento social, por outro lado, refere-se a uma habitação social dos animais em grupos, sempre que possível. Esse tipo de enriquecimento é provavelmente mais fácil de implementar e é uma fonte de interação dinâmica constante, porém existe situações em que os animais devem ser alojados isoladamente (Johansson e Ohsson, 1996). Há também protocolos experimentais onde é inserido um número maior de animais, potencializando as

interações sociais, pois animais alojados isoladamente em um ambiente enriquecido tendem a aumentar a sua resposta ao estresse agudo em vez de diminuí-la (Meijer et al., 2007). De maneira geral, uma combinação de enriquecimento social e físico é considerada ideal.

O termo "enriquecido" pode também ser substituído por "complexidade" ou "novidade" (Nithianantharajah e Hannan, 2006), mas ambos podem estar presentes em um mesmo ambiente enriquecido (AE). A complexidade e o conceito de novidades são mantidos pela troca frequente dos objetos (Reynolds et al., 2010), do formato dos tubos (Carvalho et al., 2009) e da configuração dos labirintos utilizados em algumas gaiolas (Fares et al., 2013).

Atualmente, alguns autores têm sugerido que o ambiente enriquecido representa um ambiente de criação mais natural e saudável para os animais (Würbel, 2001). Portanto, o enriquecimento ambiental seria a reprodução de um ambiente complexo e interativo, que pode promover desafios e novidades, assim como as observadas nas situações que ocorreriam normalmente no ambiente natural (Almeida et al., 2008). Por outro lado, uma gama de pesquisadores propõe que o AE é um terceiro ambiente, diferente tanto do ambiente natural quanto do ambiente padrão de laboratórios. No ambiente natural o animal está sujeito às variações inesperadas do meio, ao intemperismo, à ação de predadores, falta de recurso, às interações intra- e interespecíficas. Assim, de modo geral, não se pode prever as situações que os animais vão vivenciar (Guandolini, 2009). Já no ambiente padronizado, vários aspectos podem ser controlados, como quantidade de comida, água, temperatura, umidade, qualidade do ar, a quantidade, a periodicidade e a intensidade da luz, assim como as interações intra- e interespecíficas, entre outros (Dammy et al., 2010). Portanto, segundo estes autores, o AE pode ser considerado um terceiro ambiente, se assemelhando ao natural por proporcionar a possibilidade do aumento de interações entre os animais e dos animais com o meio, porém com controle da alimentação, do foto-período, etc., tal como no ambiente padrão de laboratórios.

Estudos comportamentais com o ambiente enriquecido estão repletos de inconsistências devidos a variáveis como duração e tipo de enriquecimento ambiental, idade dos animais, entre outros. Os protocolos utilizados na literatura podem variar em vários aspectos; os mais importantes são: o tamanho das gaiolas, o número de animais, os tipos de objetos utilizados, a idade dos animais no início da exposição ao ambiente enriquecido, a duração da exposição, a cepa do rato ou camundongo utilizado e o sexo do animal (Simpson e Kelly, 2011). Em relação a idade de início da exposição ao ambiente enriquecido, dados da literatura mostram que 41% dos trabalhos iniciam essa exposição entre a primeira e a quarta semana de vida dos animais. Estudos mostram que a habitação no ambiente enriquecido no primeiro mês de vida é

mais benéfico por ser fundamental na produção de efeitos comportamentais relativamente duradouros. Quanto à duração da exposição ao ambiente enriquecido, os protocolos variam desde minutos de exposição a meses, e é interessante notar que qualquer variação de protocolo leva a alterações comportamentais distintas (Giborvan e Plamondon, 2013).

Os efeitos do ambiente enriquecido sobre o comportamento geralmente são avaliados utilizando-se testes comportamentais amplamente validados na literatura, como o teste em cruz elevado para avaliar comportamentos associados à ansiedade (Carobrez e Bertoglio, 2005), o teste do campo aberto para avaliar atividade locomotora (Prut e Belzung, 2003), o teste do campo vazado para avaliar comportamentos associados a busca pela novidade (Escorihuela et al., 1999), o labirinto aquático radial de oito braços para avaliar aprendizado e memória (Xavier et al., 1999), entre outros.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o AE (principalmente nos períodos críticos do desenvolvimento, como a lactação e adolescência) induz modificações morfológicas, neurobiológicas, fisiológicas e comportamentais (Kempermann et al., 1997; Van Praag et al., 2000; Pryce et al., 2002). Um estudo clássico realizado por Bennett e colaboradores (1964) em ratos, indicou que a exposição à este ambiente resulta em mudanças anatômicas e neuroquímicas. Essas modificações estariam associadas à maior neurogênese, neuroproteção e mudanças na estrutura sináptica (Kempermann et al., 1997a; Van Praag et al., 2000), aumento do tamanho do cérebro e da espessura cortical (Eckert e Abraham, 2013; Van Praag et al., 2000), além de estimular a plasticidade sináptica (Leger et al., 2012a,b; Nithianantharajah e Hannan, 2011).

Pesquisas em ratos mostraram que o AE no período de lactação (Kempermann et al., 1999), pós-desmame (Nilsson et al., 1999) e na idade adulta (Kempermann et al., 1997b; Nilsson et al., 1999) estimula a neurogênese no hipocampo durante toda a vida (Cameron et al., 1993). Essas modificações anatômicas resultam em melhora da função cognitiva, que pode ser observada através da melhora da memória e aprendizagem (Van Praag et al., 2000; Leggio et al., 2005), função esta dependente do hipocampo (Kempermann et al., 1998). Além dos efeitos cognitivos, o ambiente enriquecido traz também benefícios comportamentais como por exemplo, na modulação da agressividade e no contato social, tendo sido observado que animais mantidos em ambiente rico em estímulos apresentam redução do comportamento agressivo (Armstrong et al., 1998) e melhor interação social (Nithianantharajah e Hannan, 2011; Van Praag et al., 2000; Levin, 2014).

Em relação as alterações comportamentais, experimentos mostram que quando expostos ao teste do campo aberto (CA) na idade adulta, animais que foram expostos ao AE no período

de lactação, apresentam maior atividade no centro do equipamento (Kohl et al., 2002), o que representa menor nível de ansiedade (Thiel et al., 1999). Também foram observados níveis mais baixos de ansiedade quando testados no labirinto em cruz elevado (Sztainberg et al., 2010). Esses achados corroboram estudos prévios que demonstram que o ambiente rico em estímulos reduz a ansiedade e o medo (Pascual et al., 1996; Van Praag et al., 2000; Chapillon et al., 2002; Urakawa et al., 2013; Baldini et al., 2013). O enriquecimento ambiental também modula comportamento de busca por novos estímulos reduzindo sua atividade exploratória. Quando avaliados no teste do campo vazado (CV), observou-se que animais submetidos ao AE demonstravam redução no comportamento exploratório (Brenes et al., 2009; Van Praag et al., 2000). Observou-se ainda que ratos SHR (linhagem espontaneamente hipertensa, que “naturalmente” apresenta características do transtorno do déficit de atenção com hiperatividade - TDAH) (Russel, 2007) expostos ao ambiente enriquecido apresentaram redução da sua sintomatologia, como menor atividade exploratória e locomotora, quando submetidos a novos ambientes (Pamplona et al., 2009; De Carvalho et al., 2010).

Foi demonstrado ainda que o AE aumenta a expressão de marcadores colinérgicos no cérebro de ratos jovens e idosos (Van Praag et al., 2000), reduzindo a resposta do sistema colinérgico ao estresse (Del Arco et al., 2007). Além disso, animais expostos ao AE, apresentaram redução do nível de corticosterona (Liu et al., 2000; Kohl et al., 2002; Ilin e Richter-Levin, 2009), que é tradicionalmente utilizado como marcador dos níveis de estresse, ansiedade e depressão (Holsboer, 2000; Wong et al., 2000; Cassano et al., 2001; Pryce et al., 2005), distúrbios que interagem entre si. Sabe-se ainda que a corticosterona afeta a memória e a plasticidade cerebral (Makino et al., 1999) e acredita-se que, em situações de estresse crônico, a perda de neurônios esteja relacionada com a toxicidade dos glicocorticoides (Conrad et al., 2007).

O estímulo ambiental modula também parâmetros neuroquímicos: estudos já demonstraram que animais expostos ao AE no início da vida mostram um aumento na expressão do gene para o receptor 5HT1A no hipocampo (Rasmuson et al., 1998) e um aumento nos níveis de serotonina no hipocampo e no córtex frontal (Brenes et al., 2008, 2009). Por outro lado, ratos adultos do sexo feminino, quando expostos ao AE por 30 dias, não mostraram nenhum efeito nos níveis de serotonina no hipocampo e córtex, e uma diminuição dos níveis do metabólito da serotonina (5HIAA) no hipocampo (Galani et al., 2007). Del Arco e colaboradores (2007) não encontraram efeitos do AE sobre os níveis basais de dopamina no córtex frontal em ratos alojados durante 12 meses no AE. No entanto, o mesmo grupo mostrou que uma exposição ao AE durante 12 semanas reduz a densidade do

receptor D1 no córtex pré-frontal. Além disso, a diminuição da reabsorção de dopamina e a redução da expressão de transportadores de dopamina têm sido relatados em ratos expostos ao AE no início da vida (Zhu et al., 2004, 2005). Adicionalmente, estudos mostram um aumento da noradrenalina no hipocampo (Brenes et al., 2009; Fernandez-Teruel et al., 1997), provando a capacidade do AE de promover mudanças na neuroquímica do cérebro.

Ambiente Enriquecido e drogas de abuso

A exposição ao ambiente enriquecido durante o desenvolvimento também pode ter impacto sobre as respostas às drogas de abuso e a vulnerabilidade ao abuso de drogas, o que pode ser causado pelo efeito do ambiente enriquecido sobre o sistema de recompensa do cérebro (Thiel et al., 2010). A grande maioria dos estudos foram realizados com drogas psicoestimulantes e cocaína. Um estudo mostrou que fêmeas que foram expostas ao ambiente enriquecido no início da vida se mostraram mais sensíveis aos efeitos estimulantes da cocaína em altas doses (1 mg/kg) quando avaliadas na atividade locomotora e no desenvolvimento do condicionamento da preferência de local (Smith, 2009). Uma série de estudos com cocaína mostrou que a habituação ao ambiente enriquecido durante a abstinência pode reduzir o comportamento de procura pela droga em relação aos controles. Outros trabalhos avaliaram os efeitos do ambiente enriquecido sobre a resposta comportamental e neuroquímica ao AMP (adenosina monofosfato). Assim como nos estudos com cocaína, a exposição ao ambiente enriquecido pode reduzir a autoadministração de AMP em comparação aos controles, em doses baixas 0,006 - 0,03 mg/kg (Bardo et al., 2001; Green et al., 2002). Estudos mostram ainda que ratos expostos ao ambiente enriquecido são mais sensíveis aos efeitos de locomoção, com aumento da distância percorrida, em doses agudas de AMP. Porém, quando as doses eram repetidas, esses mesmos animais foram menos sensíveis ao efeito do AMP sobre a locomoção (Bardo et al., 1995). Esses efeitos parecem ser mediados via neurotransmissão glutamatérgica no núcleo acumbente, o ambiente enriquecido pode desempenhar um papel protetor nas adaptações do sistema glutamatérgico como resultado do uso repetido de drogas (Rahman e Barto., 2008). No geral, a exposição ao ambiente enriquecido pode reduzir o desejo de drogas (Thiel et al., 2010, 2011).

Os efeitos do ambiente enriquecido sobre o uso de drogas são provavelmente mediados pelo circuito de recompensa mesolímbico principalmente através da atividade da dopamina

(DA). Estudos apontam uma capacidade reforçada, observada por uma maior atividade locomotora, para agonistas da DA nos animais expostos ao ambiente enriquecido (Hoffmann et al., 2009). O aumento dos efeitos estimulantes observados em animais expostos ao ambiente enriquecido em resposta ao aumento de dopamina é, em parte, devido a diminuições do transportador de dopamina (DAT) e do metabolismo de dopamina no córtex frontal (Zhu et al., 2004), bem como à CREB reduzida (Green et al., 2010), ao glutamato elevado (Rahman et al., 2008), em resposta à ação do AMP e da cocaína no núcleo acumbente.

Estudos recentes dão um papel central aos fatores ambientais como possíveis determinantes da sensibilidade aos efeitos sinérgicos das drogas de abuso e, portanto, à vulnerabilidade para desenvolver o vício (Solinas et al., 2010; Thiel et al., 2010). Há ampla evidência experimental sobre a associação entre toxicodependência e experiências adversas como abuso infantil, combate ao stress, abuso sexual ou estresse no trabalho (Mesa-Gresa e Moya-Albiol, 2011; Wong et al., 2011). Diversos estudos, tanto em primatas como em roedores, abordaram os efeitos negativos da exposição ao estresse em uma idade precoce, sugerindo que, nesta situação, ocorrem alterações no nível fisiológico, neurobiológico e hormonal que podem levar a maior propensão ao consumo de substâncias que causam dependência (Beauquis et al., 2010; Laviola et al., 2008; Schloesser et al., 2010).

Em pesquisa realizada em seres humanos, observou-se que experiências negativas durante os primeiros anos de vida induzem mudanças no nível estrutural e funcional cerebral que podem promover o consumo de diferentes drogas de abuso, tanto durante a adolescência quanto na idade adulta (Lee e Hoaken, 2007; Mesa-Gresa e Moya-Albiol, 2011). Por outro lado, relações familiares positivas parecem diminuir as possibilidades de consumo e podem prevenir o desenvolvimento do vício. Assim, pode-se supor que um ambiente positivo, especialmente durante períodos críticos do desenvolvimento, pode ter um efeito protetor e/ou curativo contra o uso de drogas (Laviola et al., 2008; Mesa-Gresa e Moya-Albiol, 2011; Solinas et al., 2010; Wong et al., 2011). A principal dificuldade da pesquisa em humanos está associado ao fato de que, em estudos retrospectivos, é difícil isolar o "ambiente enriquecido" de outras variáveis que podem afetar o indivíduo durante toda a sua vida (Nithianantharajah e Hannan, 2009, 2011). Portanto, sugere-se que o uso do enriquecimento ambiental em roedores poderia fornecer um modelo apropriado para investigar possíveis efeitos "protetores" de um estilo de vida positivo e ativo contra o vício (Laviola et al., 2008).

Estudos mais amplos sobre a relação entre enriquecimento ambiental e a vulnerabilidade ao vício têm sido feitos basicamente com a cocaína. Em investigações iniciais realizadas por Bézard e colaboradores mostrou-se que ratos expostos a ambientes

enriquecidos são menos sensíveis a esta droga quando comparados a ratos mantidos em ambientes normais. Além disso, os roedores do AE apresentaram um padrão de expressão diferente da proteína c-FOS, um aumento da expressão de fatores neurotrófico (especialmente BDNF) e a regulação negativa em expressão do transportador de dopamina, principal alvo de diversos psicoestimulantes (Bézar et al., 2003; Solinas et al., 2008), e diminuição na reatividade dos neurônios do estriado aos efeitos de cocaína e outras drogas dopaminérgicas (Solinas et al., 2009). Solinas e colaboradores avaliaram o efeito da exposição ao ambiente enriquecido em roedores que tinham desenvolvido anteriormente a dependência à cocaína utilizando para isso diferentes modelos animais (sensibilização, condicionamento de preferência por lugar entre outros) com base no qual sugerem que efeitos do enriquecimento ambiental não só pode ser preventiva, mas também "curativa" contra um vício já estabelecido (Solinas et al., 2010).

Green e colaboradores, 2010 levantaram recentemente a hipótese de que a ativação repetida das vias de recompensa, mediante o exercício e contato social, leva os roedores criados em ambientes enriquecidos a ficarem menos vulneráveis à autoadministração compulsiva de diferentes drogas de abuso. Em estudos experimentais, esses autores demonstraram que roedores criados em um ambiente enriquecido são menos vulneráveis à autoadministração de cocaína em comparação com os controles, apresentando, porém, um maior condicionamento no teste de preferência por lugar induzido por essa droga, uma redução de comportamentos associados com ansiedade e uma menor atividade da proteína CREB no núcleo accumbens (que se associa com a expressão reduzida do BDNF). Assim, numerosos experimentos apoiam a hipótese de que a exposição ao ambiente enriquecido pode exercer efeitos protetores ao vício, não sendo, porém, totalmente conhecidos os mecanismos.

Em relação ao álcool, diversos estudos também têm demonstrado a utilidade de manipulações ambientais em modelos animais para estudar possibilidades de intervenção no vício à essa substância (Rueda et al., 2011). Existem hipóteses que sugerem que crianças com Síndrome Alcoólica Fetal têm grandes alterações no desenvolvimento porque são criadas em ambientes de "risco", exacerbando o impacto da exposição pré-natal ao álcool.

Usando modelos animais, têm sido realizadas várias tentativas para avaliar como manipulações experimentais do ambiente pós-natal podem ser usadas para "tratar" dos efeitos da exposição alcoólica fetal. Estas abordagens incluem a manipulação pós-natal, o enriquecimento ambiental e o treinamento baseado na reabilitação motora (Hannigan et al., 2007). Em geral é observado que, quando roedores são criados em ambientes enriquecidos (motor, sensorial e social) depois de serem expostos ao álcool pré-natal, o ambiente

enriquecido pode atenuar efeitos do álcool sobre o comportamento, confirmando a existência de plasticidade cerebral.

Embora não sejam bem compreendidos os efeitos moleculares subjacentes aos efeitos do ambiente enriquecido sobre uso de drogas e a dependência química (Burrows et al., 2010), sugere-se que a exposição a este ambiente pode proporcionar uma maior capacidade de discriminar a presença de recompensa (Grimm et al., 2008). Estudos anteriores mostram que ratos em ambientes enriquecidos apresentavam um aumento no condicionamento tanto no teste de preferência como de aversão a um lugar (Bardo et al., 1995; Smith et al., 2005; Smith et al., 2003) e uma acelerada extinção no condicionamento do medo (Pietropaolo et al., 2006). Isso indica que os animais criados em ambientes enriquecidos apresentam maior capacidade de aprendizado sobre o significado de estímulos associados com a recompensa e punição e de distinguir entre "disponibilidade" e " não disponibilidade" do reforço. Mesmo durante o processo de extinção da droga os animais expostos ao ambiente enriquecido também parecem aprender mais rapidamente que suas ações não serão recompensadas e, portanto, deixam de responder mais cedo que os animais criados em ambientes não enriquecidos (Grimm et al., 2008). É importante estabelecer a base neurobiológica dos efeitos que exposição a um ambiente enriquecido induzem em sistemas de reforço, sabe-se que as vias dopaminérgicas, glutamatérgicas, mesolímbica e mesocortical, têm sido implicadas (Segovia et al., 2010).

Nicotina

A nicotina está entre as drogas lícitas mais usadas no mundo (Tanda e Goldberg, 2000), é o principal componente psicoativo do tabaco e é fundamental no estabelecimento e manutenção do hábito de fumar (Benowitz, 1998). O processo de fumar libera nicotina na fumaça do cigarro (Huang et al., 2007). Considera-se que é a nicotina que estabelece e mantém a dependência (Di Chiara, 2000; Stolerman e Shoaib, 1991). Ela é rapidamente absorvida pelos pulmões devido a extensa superfície alveolar e a fácil dissolução da nicotina no fluido pulmonar (Hukkanen e Jacob, 2005). A quantidade de nicotina absorvida pelo corpo pode ser influenciada por sua concentração na fumaça do cigarro, pela frequência e pela profundidade das tragadas. Quantidades variando entre 0,3 e 1,6 mg de nicotina (com média em torno de 1,0 mg) serão absorvidas pelo corpo por cigarro fumado (Benowitz et al., 2009).

Uma vez no sangue, a nicotina se distribui rapidamente por todo o organismo. As regiões corporais que possuem maior afinidade pela nicotina são o fígado, os rins, o baço e, principalmente o sistema nervoso (Urakawa et al., 1994). A nicotina atinge o cérebro em 10 a 20 s após a absorção (Benowitz et al., 1998), propagando-se por todas as áreas, das regiões mais internas até o córtex (Rosemberg, 1999). Sua maior concentração no sangue, em uso regular, se dá após 5 a 10 min do início do consumo e sua meia-vida de eliminação é de aproximadamente 2 h no homem. A nicotina é metabolizada principalmente no fígado (80% a 90%) e em menor proporção nos pulmões e rins (Hukkanen e Jacob, 2005). A cotinina é o metabólito da nicotina que se apresenta em maior quantidade (70% a 80%), pode ser medida no sangue, urina e saliva (Nel e Morgan, 1996), e tem meia-vida de eliminação longa, cerca de 20 h em humanos (Taylor, 1996) e de 5,2 horas em roedores (Kyerematen e Vesell, 1991). Estas propriedades da cotinina permitem que ela seja frequentemente utilizada para estimar a quantidade de nicotina a que o indivíduo se expôs (Davis et al., 1991).

As ações da nicotina no sistema nervoso central (SNC) são mediadas por receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) (Dani e Bertrand, 2007), que são canais catiônicos pentaméricos amplamente expressos em sítios pré- e pós-sinápticos no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (Leonard et al., 2001). No desenvolvimento cerebral, os nAChRs são detectados desde o início do desenvolvimento embrionário em humanos e outros animais (Tribollet et al., 2004). Os nAChRs podem modular a liberação de neurotransmissores, a ação sináptica e a atividade neuronal através de alterações em seus estados funcionais (Dani et al., 2000). A combinação entre os subtipos α e β é responsável pela grande quantidade de receptores que irão desempenhar inúmeras ações importantes em muitos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o desenvolvimento neuronal, ansiedade, aprendizado e memória (Bergink., 2004; Dani et al., 2007; Dani e Balfour, 2011; Dwyer et al., 2008). Há evidências de que os nAChRs também estão envolvidos em processos como controle do sono (Domino e Yamamoto, 1965; Salin-Pascual et al., 1999) e funções do sistema nervoso autônomo (Xu et al., 1999). Adicionalmente, os nAChRs podem estar envolvidos em desordens neurológicas como epilepsia noturna, esquizofrenia, Parkinsonismo e doença de Alzheimer (Dani e De Biasi, 2001; Leonard et al., 2001; Levin e Simon, 1998; Moulard et al., 2001; Rested et al., 2000).

Tabaco e adolescência

Aproximadamente um terço da população mundial é constituída por fumantes, sendo que a maioria iniciou o hábito de fumar durante a adolescência (Mansvelder e McGehee, 2002). Estudos mostram que a probabilidade de parar de fumar na idade adulta diminui substancialmente quando o hábito de fumar é iniciado durante a adolescência (Klein et al., 2004) e que o consumo de cigarros diários é maior em indivíduos que iniciam o hábito na adolescência quando comparados com indivíduos que iniciam o hábito na idade adulta (Chen e Millar, 1998; Nelson et al., 1995; Pierce e Gilpin, 1996). Adicionalmente, adolescentes já expressam sintomas de dependência à nicotina após o consumo de apenas alguns cigarros (Di Franza et al., 2002). Após um ano do início do hábito de fumar, a maioria dos adolescentes fumantes relatam tentativas de parar. Entretanto, devido aos efeitos adversos da abstinência, 97% desses adolescentes fumantes ainda continuam a fumar, e dois anos mais tarde a maioria destes fumantes se diz dependente (McNeill, 1991).

Em humanos, a adolescência é caracterizada por traços comportamentais como impulsividade e comportamento de risco que estão associadas com o aumento de vulnerabilidade para transtornos neuropsiquiátricos, incluindo doenças afetivas e dependência (Arnett, 1999; Andersen, 2003; Volkow e Li, 2005). Estudos com roedores têm mostrado que adolescentes exibem diferenças quando comparados com adultos em relação a medidas de ansiedade, depressão e reatividade ao stress (Adriani e Laviola, 2004; Slawecki, 2005). Ratos adolescentes podem exibir níveis menores (Cheeta et al., 2001; Imhof et al., 1993) ou maiores (Slawecki, 2005; Doremus et al., 2003; Primus e Kellog, 1989) de ansiedade em análises comportamentais quando comparados com adultos, apresentam elevados níveis de busca pela novidade (Adriani et al., 1998), impulsividade (Adriani e Laviola, 2003) e comportamento de risco (Macri's et al., 2002), assim como redução de resposta ao estresse (Adriani e Laviola, 2000). A impulsividade, desejo por novidades e experiências excitantes são comportamentos envolvidos na iniciação do uso de drogas, e de fato, a intensa busca pela novidade, característica do período da adolescência, tem sido associada a um maior consumo de drogas de abuso (Abreu-Villaça et al., 2006; Spear, 2000). Estudos em seres humanos têm encontrado forte correlação entre altas taxas de busca por sensações novas e uso de drogas, incluindo nicotina e etanol (Zuckerman, 1994). Além disso, a dependência à nicotina e ao álcool tem sido associada a altos níveis de impulsividade (Mitchell, 1999; Poulos et al., 1998). De fato, adolescentes são mais propensos a uma variedade de comportamentos de risco, incluindo o uso de drogas (Martin et al., 2002). Diversos estudos mostram que é nesse período

que frequentemente ocorre a experimentação de drogas como tabaco e álcool (Grant et al., 1987; Kandel e Yamaguchi, 1985; Nelson et al., 1995).

Existem também evidências que o início do uso de drogas está relacionado aos efeitos farmacológicos agudos como o alívio da ansiedade ou do stress e a indução de um estado de euforia. Ambos, nicotina e etanol, apresentam efeito de redução de ansiedade. Em relação à nicotina, há relatos de propriedades ansiolíticas. Porém, estas propriedades têm sido observadas primariamente em indivíduos dependentes de nicotina, nos quais a droga pode agir prevenindo ou aliviando a ansiedade gerada pela retirada da droga (Little, 2000). Desta forma, o desenvolvimento do vício está associado com um contato precoce com a droga (Robins e Przybeck, 1985).

Os comportamentos característicos da adolescência podem ser explicados pela remodelação pelo qual o cérebro do adolescente está passando (Powell, 2006). Durante a adolescência, o desenvolvimento neural ocorre em regiões associadas com a motivação, a impulsividade e o vício. A impulsividade e a busca pela novidade são traços comportamentais transicionais que podem ser explicados, em parte, por mudanças na maturação dos sistemas corticais frontais e subcorticais monoaminérgicos. As mudanças no desenvolvimento dos circuitos neurais envolvidos no controle de impulsos têm implicações significativas para entender o comportamento adolescente (Chambers et al., 2003).

O cérebro durante a adolescência está em transição, regiões neurais como o córtex pré-frontal e outras regiões de projeções dopaminérgicas do prosencéfalo apresentam alterações proeminentes durante esta fase. Dada a importância dessas regiões cerebrais na modulação de mecanismos de recompensa associados ao uso de drogas (Koob, 1992), de respostas a agentes estressores (Dunn e Kramarcy, 1984) e a associação entre ambos (Goeders, 1997; Piazza et al., 1991), não é surpresa constatar que adolescentes respondem de formas diferentes às drogas de abuso, aos agentes estressores e à interação entre ambos, quando comparados com adultos (Spear, 2002).

O cérebro adolescente apresenta continuada maturação do sistema neural, mas também perda de aproximadamente metade do número de conexões sinápticas em algumas regiões neurais (Rakic et al., 1994), perda esta que pode servir para refinar as conexões e aumentar a eficiência cerebral durante a adolescência (Chugani, 1996). Uma região cerebral que é altamente modificada em várias espécies durante adolescência é a do córtex pré-frontal, área fortemente relacionada com as habilidades cognitivas (Diamond, 1991). O volume do córtex pré-frontal diminui durante a adolescência, tanto em humanos (Jernigan et al., 1991) quanto em ratos (Van Eden et al., 1990). Foi demonstrada, em seres humanos (Huttenlocher, 1984) e

primatas não-humanos (Zecevic et al., 1989), a eliminação de sinapses no córtex pré-frontal e outras regiões corticais. Outros autores descrevem ainda um aumento de projeções dopaminérgicas no córtex pré-frontal de humanos e ratos adolescentes (Kalsbeek et al., 1988), decorrente da substancial reorganização que o sistema dopaminérgico sofre durante a adolescência. A região dorsolateral do córtex pré-frontal, área relacionada ao controle de impulsos, sofre contínuos processos de mudanças durante a adolescência (Giedd, 2004; Sowell et al., 2001). Alterações relacionadas à maturação durante a adolescência também são evidentes em outras regiões cerebrais como no hipocampo de roedores (Dumas e Foster, 1998) e no de seres humanos (Benes, 1989). Durante este período, estas áreas cerebrais apresentam proliferação e maturação de terminais axonais e sinapses (Stamford, 1989; Teicher et al., 1995).

O primeiro artigo abordando efeitos da nicotina no sistema nervoso durante a adolescência foi publicado somente em 1999 (Trauth et al., 1999). Desde então, vários estudos em animais experimentais vêm demonstrando que a exposição à nicotina durante a adolescência produz alterações neurocomportamentais persistentes (Ribeiro-Carvalho et al., 2011; Abreu-Villaça et al., 2007, 2008). Além disso, a exposição à nicotina durante a adolescência também resulta em mudanças da atividade neurofisiológica em adultos (Slawecki et al., 2003). Estudos utilizando roedores adolescentes expostos à nicotina proporcionam suporte neuroquímico e comportamental para a hipótese da adolescência como período crítico (Abreu-Villaça et al., 2010; Oliveira-da-Silva et al., 2009; Adriani et al., 2003; Laviola et al., 2003). De fato, diversos estudos têm mostrado diferenças de respostas comportamentais entre roedores adultos e adolescentes (Briellmaier et al., 2007; Doremus et al., 2004; Elliott et al., 2005; Kota et al., 2007; Wilmouth e Spear, 2006). Alguns efeitos da nicotina parecem depender do sexo. Foi demonstrado que ratos machos adolescentes expostos à nicotina apresentam maior risco de consumo de opióides e nicotina na idade adulta (Adriani et al., 2003). Adicionalmente, ratos fêmeas são mais sensíveis aos efeitos ansiolíticos da nicotina quando comparadas a ratos machos (Cheeta et al., 2001). Estudos do nosso grupo vêm demonstrando que a exposição à nicotina no período da adolescência apresenta uma série de associações com alterações comportamentais, seja antes, durante ou depois do período de exposição.

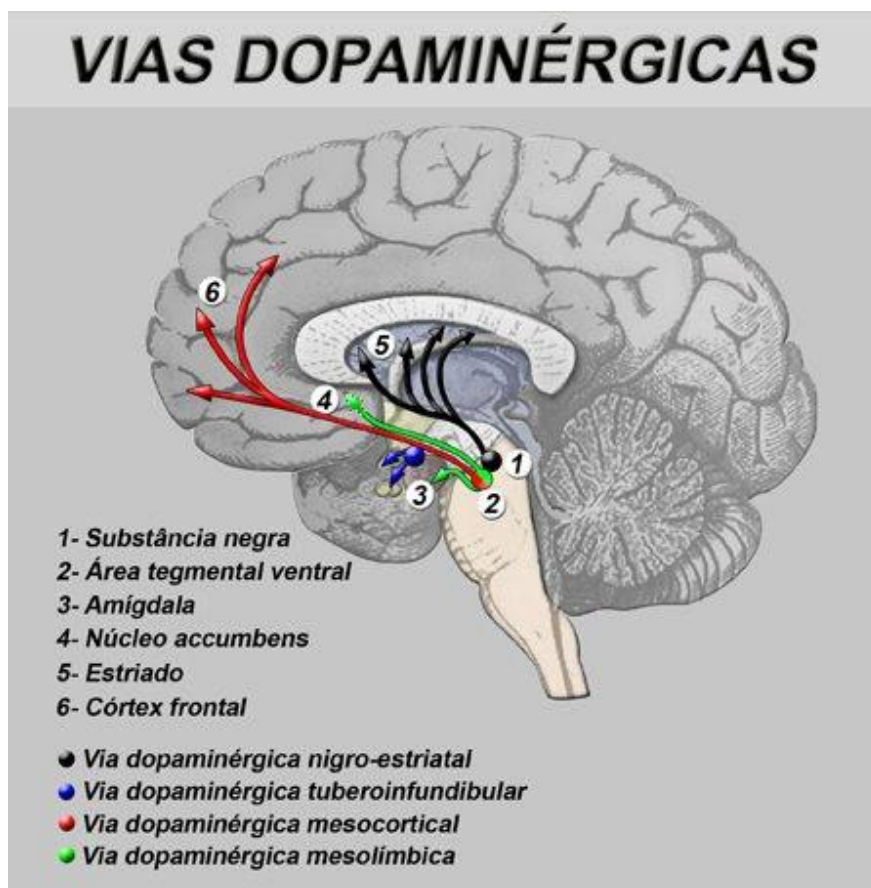
Nicotina e via de recompensa

Vários estudos têm mostrado, ao longo do tempo, que existe uma cadeia de reações, envolvendo os diversos neurotransmissores citados nos mecanismos de ação das diferentes drogas de abuso, que culmina com a liberação da dopamina na porção ventral do núcleo estriado chamada de núcleo acumbente (NA). O NA recebe projeções de neurônios dopaminérgicos localizados na área tegmental ventral, local de convergência para estímulos procedentes da amígdala, hipocampo, córtex entorrinal, giro do cíngulo anterior e parte do lobo temporal. Do núcleo acumbente partem eferências para o septo hipocampal, hipotálamo, área cingulada anterior e lobos frontais (Figura 1). Devido às suas conexões aferentes e eferentes, o NA desempenha importante papel na regulação da atribuição de saliência (relevância) das emoções, da motivação e da cognição (Berthoud, 2006; Fulton, 2010).

O sistema mesocorticolímbico de recompensa estende-se a partir da área tegmental ventral até o NA, passando para diferentes áreas, como o sistema límbico e o córtex orbito-frontal. Os receptores dopaminérgicos D1R e D2R no núcleo acumbente (Durieux et al., 2009; Meyer, 1993) e no estriado dorsal (Durieux et al., 2012; Pittz e Horvitz, 2000) têm sido associados com comportamentos de ansiedade, medo e atividade locomotora. Alterações na ativação desses receptores, como por exemplo no caso da exposição à nicotina, podem causar mudanças comportamentais. Alterações no sistema dopaminérgico, como por exemplo, a diminuição dos receptores D2 de dopamina, poderiam ser responsáveis por alterações neste sistema recompensa quando da utilização de drogas de abuso.

Este sistema está ativado quando sentimos prazer, satisfação, ou seja, sensação de bem-estar. Esta circuitaria do sistema de recompensa é alimentada por estas sensações. Quando se utiliza drogas de abuso que proporcionem sensações de prazer, o sistema é ativado, sempre mediado pela dopamina. Interessante perceber que pessoas com deficiência inata no sistema de recompensa sempre estão buscando uma maneira de ativar este sistema. Assim, por meio da memória neuronal, esse sistema seria marcado pelo prazer obtido pela droga, o que acarretaria no comportamento de procura pela substância (Durieux et al., 2012).

Figura 1 – Vias dopaminérgicas



Fonte: <http://oneurotransmissor.blogspot.com/2013/05/patologias-causas-esquizofrenia.html?m=1>, 2013

Como o circuito de recompensa é ativado pela liberação de dopamina, alterações na quantidade do neurotransmissor ou na sensibilidade dos receptores D2 podem provocar, naqueles que apresentam estas alterações, uma falta de controle nos impulsos, com busca de maior intensidade por sensações prazerosas, podendo caracterizar uma impulsividade. Inicialmente, o impulso que é perfeitamente controlável para a maioria das pessoas é conduzido de forma diferente por uma minoria. Este controle está localizado em uma região cerebral chamada de córtex órbito-frontal. Pessoas com lesões funcionais nesta circuitaria podem apresentar dificuldades de controlar seus impulsos, aspecto determinante no processo de dependência. Foi demonstrado que mesmo drogas que não estão diretamente relacionadas ao sistema dopaminérgico são capazes de promover a ativação dopaminérgica indiretamente pela sensação de conforto e prazer (Durieux et al., 2009).

Qualquer substância, tais como, drogas de abuso, como a nicotina (McBride et al., 1999) e alimentos palatáveis, que ative a via de recompensa cerebral, repercutindo na liberação de dopamina repetidamente, ou que reduza a sua captação, que é realizada pelo

transportador de dopamina (DAT), é capaz de gerar dependência, podendo gerar o vício e o abuso.

Ambiente Enriquecido e nicotina

Como já foi descrito anteriormente, a nicotina é a principal substância envolvida na dependência do tabaco e seus efeitos fisiológicos e comportamentais foram amplamente avaliados em animais e em seres humanos. Os resultados destes estudos sugerem que a nicotina melhora a função cognitiva (Levin et al., 2006) e que o ambiente enriquecido modula alguns dos efeitos motores e neuroquímicos da nicotina em roedores (Coolon e Cain, 2009), embora estes efeitos pareçam depender de fatores como idade, sexo (Ericson et al., 2010; Gomez et al., 2008; Isiegas et al., 2009), dosagem e/ou via de administração (Klein et al., 2004; Matta et al., 2007; Skwara et al., 2012). Foi relatado que ratos alojados em um ambiente enriquecido mostram menor sensibilidade para os efeitos estimulantes de nicotina (Green et al., 2003) e para apresentar as alterações nos receptores colinérgicos associadas com a hiperatividade produzida por esta droga (Coolon e Cain, 2009). A nicotina também bloqueia o aumento da ramificação dendrítica no núcleo acumbente relacionadas com o ambiente enriquecido (Hamilton e Kolb, 2005). Além disso, foi observado um aumento da liberação de dopamina na área cortical pré-frontal medial em animais alojados em ambiente enriquecido e tratado com nicotina (Zhu et al., 2007). Muitos estudos tentaram esclarecer os fatores genéticos e moleculares envolvidos na dependência por nicotina, porém poucos trabalhos têm sido realizados a fim de esclarecer a influência dos fatores ambientais associados com a progressão da dependência à nicotina (Laviola et al., 2008; Solinas et al., 2010; Mesa-Gresa et al., 2012). A atual falta de dados relativos à utilização combinada de nicotina e ambiente enriquecido é um obstáculo para a determinação dos efeitos da manipulação ambiental das respostas comportamentais a esta droga.

Diferentes estudos têm revelado que as experiências negativas e estressantes no início da vida podem provocar alterações estruturais e funcionais do cérebro que incentivam o consumo de drogas de abuso durante a adolescência e na idade adulta (Mesa-Gresa e Moya-Albiol, 2011; Nader et al., 2012). Dados da literatura mostram que a exposição a ambientes enriquecidos durante estágios críticos de desenvolvimento, tais como adolescência, aumentam os efeitos da exposição a este, podendo reduzir a susceptibilidade ao desenvolvimento de

doenças neurológicas e de doenças mentais (Laviola et al., 2003), além da própria dependência (Solinas et al., 2010; Nader et al., 2012).

Recentemente, o enriquecimento ambiental tem sido proposto como robusto instrumento na pesquisa neurocomportamental, especialmente no que se refere ao seu papel não somente na prevenção, mas também na possibilidade de cura no campo da dependência a diferentes drogas de abuso (Solinas et al., 2010). À luz dos estudos publicados sobre os efeitos comportamentais do ambiente enriquecido e da relevância da exposição dos indivíduos a este ambiente durante o início da vida, e levando-se em conta, adicionalmente, as pesquisas sobre os efeitos emocionais e cognitivos da nicotina durante a adolescência (Levin et al., 2006), pode-se supor que estes dois fatores interajam afetando a neurobiologia do indivíduo em desenvolvimento, levando a alteração que podem ser avaliadas em testes comportamentais.

De maneira geral, as evidências indicam que os animais criados em condições enriquecidas mostram maior curiosidade, maior atividade dirigida a objetivos e que respondem melhor a ambientes desconhecidos do que aqueles alojados em condições não enriquecidas. Os efeitos simultâneos sobre o funcionamento do eixo HPA, sistemas de neurotransmissores e neurotrofinas denotam a natureza positiva do enriquecimento ambiental em animais (Simpson et al., 2011). O papel do ambiente na regulação do comportamento e nos efeitos de diferentes drogas tem sido enfatizado como resultado da hipótese que sustenta que o ambiente enriquecido desempenha, como mencionado anteriormente, um papel protetor contra o desenvolvimento de dependência de diferentes drogas de abuso (Solinas et al., 2008, 2010). Poucos estudos, no entanto, avaliaram as consequências da exposição a um ambiente enriquecido durante as fases precoces do desenvolvimento e a administração de nicotina durante a adolescência. Neste sentido, a nossa hipótese é de que a exposição ao ambiente enriquecido durante a infância pode exercer um efeito protetor de curto e de longo prazo, tanto comportamental quanto neuroquímico, em animais tratados com nicotina durante a adolescência.

1 OBJETIVOS

Considerando-se as evidências de que o ambiente enriquecido (AE) tem um papel na regulação do comportamento e nos efeitos de diferentes drogas, o presente estudo tem como objetivo avaliar, em camundongos Suíços, o impacto da exposição ao ambiente enriquecido durante a infância nos efeitos causados pela exposição à nicotina durante a adolescência sobre parâmetros comportamentais relacionados à atividade locomotora, a comportamentos associados à busca por novos estímulos, a comportamentos associados à ansiedade, bem como sobre parâmetros neuroquímicos dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico, em duas etapas da vida do animal, adolescência e idade adulta.

1.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar, em animais deste modelo experimental de exposição ao AE e subsequente tratamento com nicotina, à atividade locomotora e os comportamentos associados à ansiedade no Campo Aberto em PN45 (adolescência) e PN75 (idade adulta);
- b) Avaliar-comportamentos associados à busca por novos estímulos e à ansiedade no Campo Vazado em PN45 e PN75;
- c) Avaliar, no córtex cerebral os níveis de dopamina e de DOPAC em PN45 e PN75;
- d) Avaliar, no córtex cerebral os níveis de noradrenalina em PN45 e PN75.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um trabalho de natureza experimental, tendo sido integralmente desenvolvido no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os experimentos descritos aqui foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG / UERJ (protocolo nº CEA/004/2012) 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 National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos da América.

O biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia (LN) do DCF / IBRAG / UERJ apresenta um ciclo claro/escuro diário de 12 h (início do fotoperíodo = 01:00 h) e temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). Os animais tiveram livre acesso à água filtrada e à ração comercial para roedores.

2.1 Animais e grupos experimentais

Neste estudo utilizamos 208 camundongos Suíços obtidos de 26 ninhadas. Para a obtenção das ninhadas experimentais, todas nascidas e mantidas no biotério de camundongos do LN, os acasalamentos foram realizados utilizando-se um macho e até três fêmeas por gaiola. Após a constatação da gravidez, as fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais. As fêmeas grávidas foram acompanhadas diariamente até o nascimento. O dia do nascimento foi considerado com o primeiro dia pós-natal (PN1). Utilizamos somente ninhadas que apresentaram entre 8 a 12 animais no dia de nascimento com o objetivo de tornar mais homogêneo o aleitamento e o padrão de cuidado dos filhotes. No 1º dia de vida pós-natal (PN1), reduzimos as ninhadas para 8 animais, procurando equilibrar as ninhadas pelo sexo (verificado pela distância urogenital). Em PN30, os filhotes foram separados das progenitoras. Desta data em diante os animais foram separados por sexo em gaiolas com no mínimo 2 e no máximo 4 animais, sempre do mesmo sexo. Durante todo o período experimental, nenhum animal ficou sozinho em gaiola no biotério.

Figura 3 – Gaiola padrão para camundongos



Legenda: Foto em visão oblíqua da gaiola padrão.

2.3 Tratamento com nicotina

Para avaliar os efeitos da exposição à nicotina, foram utilizadas minibombas osmóticas (modelo 1002, Alzet Durect Corporation, Cupertino, EUA) contendo nicotina. As minibombas foram preparadas no dia anterior à implantação (esta realizada em PN30) para que pudessem ficar durante a noite em uma solução salina, de modo a garantir que a liberação da nicotina acontecesse de forma homogênea e constante após a implantação (procedimento recomendado pelo fabricante). Assim, as minibombas dos animais alocados para o grupo NICOTINA (NIC) foram preenchidas com nicotina *free base* diluída em solução salina (NaCl 0.9%), levando a uma dose inicial de 24 mg/kg/dia de nicotina (Andrew et al., 2009), compatível com uma exposição moderada em humanos. Já as minibombas dos animais alocados para o grupo SALINA (SAL) foram preenchidas apenas com solução salina. Um dia antes da cirurgia, os animais receberam injeções de antibiótico (Baytril, 2,5 mg/kg i.p.) e analgésico (Banamine, 2,5 mg/kg i.p.). Desta forma, em PN30, os animais foram anestesiados com xilasina (Anasedan, 20 mg/kg, i.p.) e ketamina (Dopalen, 100 mg/kg, i.p.). Uma área no dorso do animal foi tricotomizada e higienizada com uma solução de álcool etílico (70%), e uma incisão longitudinal à medula espinhal do animal foi realizada com um bisturi. Com uma tesoura romba, o tecido subcutâneo foi divulsionado de forma a permitir a inserção da

minibomba osmótica. A incisão foi, então, suturada utilizando fio de sutura (catgut simples 3.0) e os animais foram devolvidos para as suas caixas para se recuperarem da anestesia. No dia seguinte à implantação, os animais receberam novamente as injeções de antibiótico e analgésico. O período de liberação do conteúdo das minibombas até seu completo esvaziamento, em ambos os casos, é de 14 dias (informação fornecida pelo fabricante).

O estudo completo, considerando-se a exposição aos diferentes ambientes (enriquecido e controle) o tratamento com nicotina ou salina, foi composto pelos seguintes grupos experimentais: 1) CONT+SAL; 2) CONT+NIC; 3) AE+SAL; 4) AE+NIC.

2.4 Desenvolvimento somático dos animais

As massas corporais das progenitoras e dos filhotes foram avaliadas de 5 em 5 dias até PN30.

2.5 Testes comportamentais

Em PN45 (adolescência) e PN75 (idade adulta), os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais. A fim de serem ambientados, os camundongos foram transportados para a sala de teste comportamental 10 min antes de seu início (às 13:00 h). Os animais foram inicialmente submetidos ao teste com o Campo Aberto (CA). Duas horas depois, os animais foram submetidos ao teste com o Campo Vazado (CV).

2.5.1 Teste do Campo Aberto (CA)

O teste do campo aberto (*open field test* no original em Inglês) é amplamente empregado para avaliar a atividade locomotora e a exploratória dos animais e, secundariamente, para identificar comportamentos associados à ansiedade (Hall, 1934; Matsuo et al, 2010; Sansar et al, 2010; Abreu-Villaça Y et al, 2013). O teste do CA consiste em colocar o animal individualmente em uma caixa quadrada a qual ele pode explorar livremente por 5 min. A caixa tem as seguintes dimensões: 45,5 cm de comprimento, 34 cm

de altura e 45,5 cm de profundidade, e possui as paredes e assoalho pintados de preto (Figura 4). Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo posicionada acima da caixa (1 metro do assoalho) e a avaliação do comportamento foi feita a partir do material gravado. Para a realização das contagens, a arena foi dividida em 16 retângulos iguais com o auxílio de um celofane sobreposto sobre a imagem da arena. Os retângulos que estavam adjacentes às paredes do CA foram considerados como pertencentes à borda do equipamento (Br, $n = 12$) e os que não encostavam nas paredes foram considerados como centrais (C, $n = 4$). O número total (C + Br) de retângulos ultrapassados pelas quatro patas dos animais (entradas) foi utilizado como medida de atividade locomotora. Os tempos de permanência na borda e no centro também foram contabilizados pelo programa usado para a contagem. O percentual de entradas no centro [entradas C / (entradas C + Br)] e o tempo de permanência no centro foram utilizados como indicadores de ansiedade. Adicionalmente, os comportamentos etológicos de autolimpeza e levantamento (atividade vertical) foram analisados. O CA foi limpo após cada teste com uma toalha de papel embebida em uma solução de álcool etílico (70%).

Figura 4 – Campo Aberto (CA)

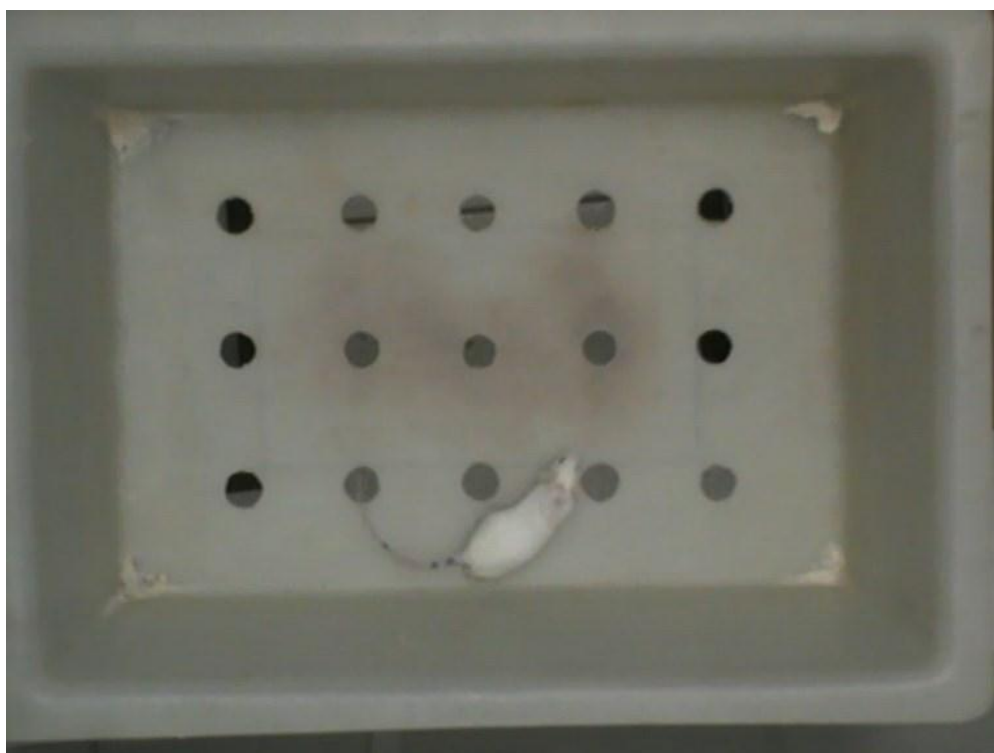


Legenda: Foto em vista superior do CA

2.5.2 Teste do Campo Vazado (CV)

O teste do campo vazado (*hole board test* do original em Inglês) é utilizado para avaliar a busca por novos estímulos (Figura 5). Os animais são individualmente colocados em uma arena com 15 orifícios em seu piso e podem explorar (inserir o focinho abaixo do nível do assoalho do campo de teste) o campo por 5 min. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo posicionada acima da caixa (1 metro do assoalho) e a avaliação do comportamento foi feita a partir do material gravado. Estes orifícios estão distribuídos uniformemente pelo assoalho e o diâmetro permite a colocação da cabeça do animal através destes. Os orifícios que estavam adjacentes às paredes do CV foram considerados como pertencentes à borda do equipamento (Br, $n = 12$) e os que não encostavam nas paredes foram considerados como centrais (C, $n = 3$). O número total (C + Br) de orifícios explorados pelos animais foi utilizado como medida de busca por novos estímulos. Os tempos de permanência na borda e no centro também foram contabilizados pelo programa usado para a contagem. Adicionalmente, os comportamentos etológicos de autolimpeza e levantamento (atividade vertical) foram analisados. O CV foi limpo após cada teste com uma toalha de papel embebida uma solução de álcool etílico (70%).

Figura 5 – Campo Vazado (CV)



Legenda: Foto em vista superior do CV.

2.6 Análise neuroquímica

Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para a retirada de tecidos para a análise neuroquímica. Em PN45 e PN75 (portanto, 2 grupos independentes de animais por idade), os animais foram decapitados e, imediatamente, o córtex, cerebelo, mesencéfalo, bulbo/tronco, hipocampo, hipotálamo, hipófise e as adrenais foram dissecados e o soro coletado.

A metodologia de análise de dopamina, DOPAC e noradrenalina em áreas do cérebro de camundongos Suíços foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* no original em Inglês). Esta metodologia foi otimizada para as nossas condições analíticas a partir dos artigos de Yoshitake e colaboradores (2004; 2006) e Nohota e colaboradores (1994).

O equipamento utilizado foi um HPLC da marca Shimadzu Prominence LC-20AT com detector de fluorescência (RF-20A) ajustado para λ de excitação em 345 nm e λ de emissão em 480 nm. A fase móvel utilizada foi um sistema de gradiente acetonitrila/tampão acetato 20 mM pH 4,5 contendo EDTA 0,5 mM, sendo um gradiente específico para dopamina, DOPAC e noradrenalina, com fluxo de 0,1 ml/min e tempos de corrida por amostra de 70 min para estas catecolaminas. Foram construídas curvas de calibração para cada composto antes das análises com massas destes analitos de 1, 2 e 4 pmol em cada vial. O coeficiente de variação do método é de até 10% para as catecolaminas.

Após a extração do hipocampo e do córtex occipital, as amostras foram congeladas a -70°C. No dia da análise, após o descongelamento das amostras à temperatura ambiente, foi realizado a homogeneização do tecido com 200 μ l de HClO₄ 0,1 M + ácido ascórbico 20 μ M em temperatura de 14°C (equipamento: Precellys). Centrifugação em microcentrífuga de eppendorf a 5.200 \times g por 30 min a 4°C. Filtração do sobrenadante em filtro PVDF de 0,22 μ m. Diluição do filtrado 5 \times com água milli-Q.

Foram pipetados no vial para injeção no HPLC: 10 μ l do filtrado diluído 2 \times + 20 μ l Glicina 2,5 M + 10 μ l NaIO₄ 5 mM + 20 μ l ACN conc. Homogeneização e incubação por 3 min seguido de adição de 50 μ l reativo de fluorescência (DPE 0,1 M/glicina 0,1 M/metóxido de sódio 0,4 M). Reação por pelo menos 3 min a frio seguida da injeção de 20 μ l no HPLC.

2.7 Quantificação da cotinina plasmática

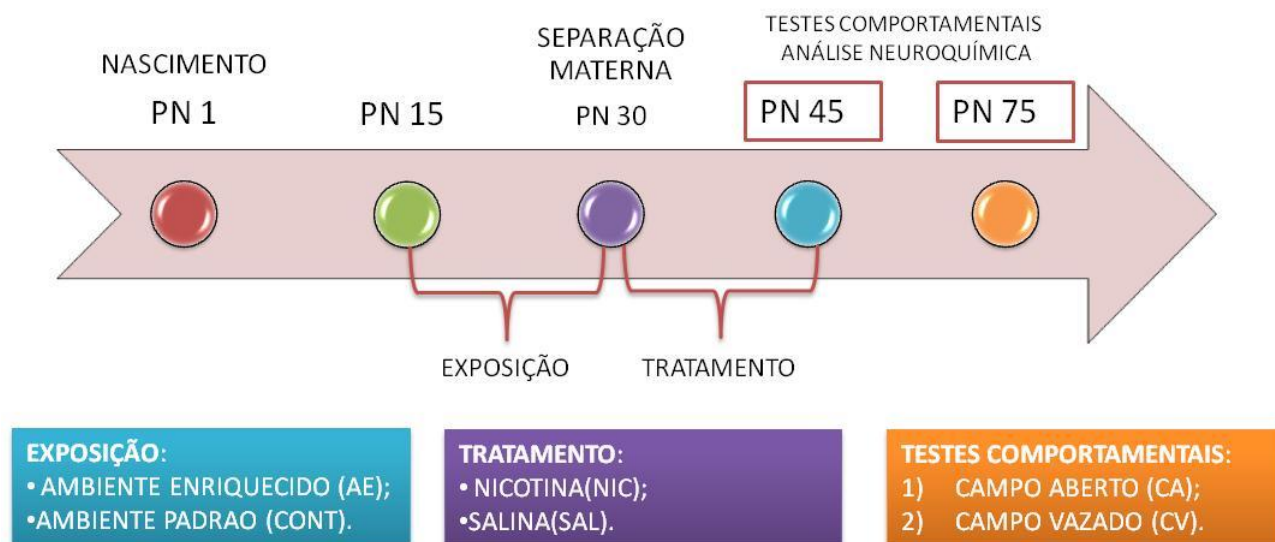
Os níveis plasmáticos de cotinina dos filhotes foram mensurados em camundongos tratados com nicotina, tanto do grupo controle, quanto do exposto ao ambiente enriquecido. Em PN45, no último dia do tratamento com a nicotina, os camundongos foram decapitados e o sangue foi coletado (CON+NIC = 8; AE+NIC = 9). Este foi centrifugado a $2.000 \times g$ por 20 min e o sobrenadante estocado a -20°C até o dia do ensaio. Os níveis de cotinina foram determinados através do modo espectrofotométrico utilizando um kit de ensaio para cotinina da Orasure Technologies (Pennsylvania, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Em uma placa contendo 96 poços foram pipetados 10 μl de material (soro) e encubados por 30 min com 100 μl de conjugado enzimático (cotinina marcada com peroxidase de raiz forte diluída em uma matriz de proteínas com estabilizantes), em condições isentas de iluminação, a temperatura de 15° a 27°C . A placa foi então lavada 5 \times com 300 μl de água destilada e incubada novamente 30 min com 100 μl de substrato reagente (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), em condições idênticas a primeira incubação. Após este período, a reação era interrompida com reagente próprio (ácido sulfúrico, 2 N) e a placa era então lida com filtro de 450 nm, em até 30 min. Todo o material utilizado nesse ensaio pertence ao kit adquirido.

Os valores obtidos foram então correlacionados com uma curva padrão de calibradores fornecidos pelo fabricante do kit, que passou pelo mesmo tratamento que o material a ser quantificado.

2.8 Desenho global do experimento

Figura 6 – Linha do tempo do experimento



Legenda: PN – dia pós-natal.

Fonte: A autora, 2017.

2.9 Análise quantitativa

2.9.1 Aspectos preliminares

Todas as distribuições de dados foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para uma amostra. As avaliações de normalidade foram feitas para cada grupo experimental separadamente. Para valores de $P \geq 0,05$ (bicaudal), as distribuições foram consideradas paramétricas e as análises posteriores foram realizadas considerando-se esta característica. Os dados com distribuição paramétrica serão apresentados como médias \pm erros padrão das médias.

2.9.2 Análise da evolução da massa corporal

As massas corporais das progenitoras (entre PN1 e PN30) e das proles foram analisadas independentemente através de análises de variância com medidas repetidas (ANOVA_r). O fator utilizado foi a EXPOSIÇÃO (AE ou CONT). O fator de repetição utilizado foi o DIA e a variável utilizada foi a massa corporal em gramas (g). Os dados de massa corporal da prole de PN1 a PN30 foram analisados com uma ANOVA_r bifatorial univariada onde o GRUPO e o SEXO (M ou F) foram considerados como fatores e a variável utilizada foi a massa corporal em gramas.

2.9.3 Parâmetros comportamentais

Os dados foram analisados usando-se análises de variância multivariadas. Os seguintes fatores foram utilizados: IDADE (PN45 ou PN75); SEXO (M ou F); EXPOSIÇÃO (AE ou CONT) e TRATAMENTO (NIC ou SAL).

2.9.4 Parâmetros neuroquímicos

Os dados foram analisados usando-se análises de variância univariadas. Os seguintes fatores foram utilizados: IDADE (PN45 ou PN75); SEXO (M ou F); EXPOSIÇÃO (AE ou CONT) e TRATAMENTO (NIC ou SAL).

2.9.5 Aspectos complementares

Coeficientes de correlação de Pearson (ρ) foram calculados para todos os pares de variáveis de um mesmo segmento experimental (CA, CV e neuroquímica).

Os efeitos de fatores individuais foram considerados significativos quando $P < 0,05$ (bicaudal). Para interações entre fatores, nos casos em que $P < 0,10$ (bicaudal) os fatores interativos foram separados e as ANOVAs repetidas para verificar se os efeitos eram mantidos. Análises post hoc serão realizadas utilizando-se ANOVAs de menor ordem e o teste de Fisher (Fisher's Protected Least Significant Difference – FPLSD) para as comparações par a par.

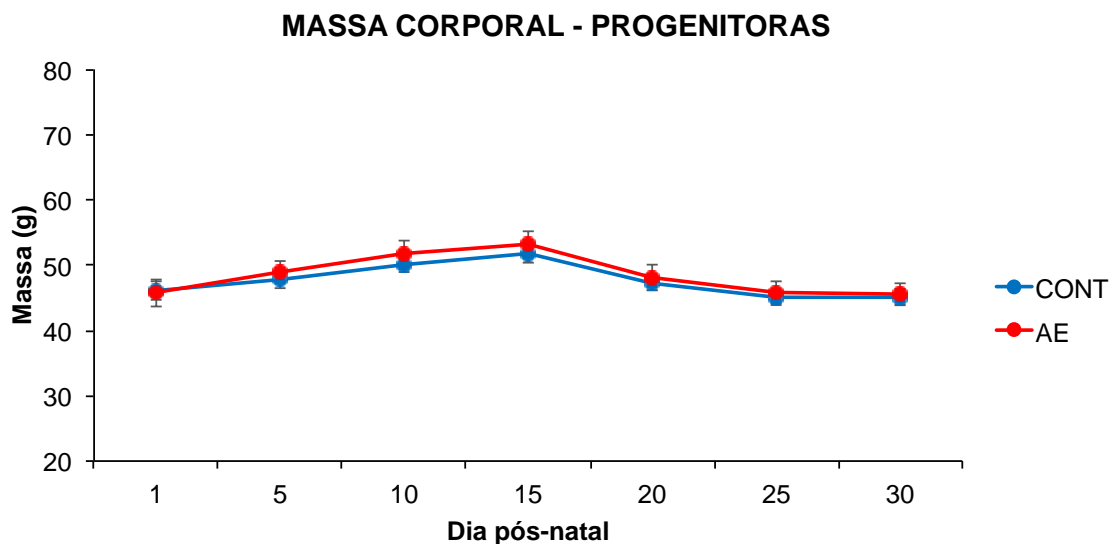
3. RESULTADOS

3.1. Massa corporal

3.1.1. Progenitoras

A ANOVAr para os dados de massa corporal das progenitoras indicou um efeito do DIA ($F = 52,6$; $gl = 3,98$; $P < 0,001$), não sendo verificado efeito da EXPOSIÇÃO ou interação DIA \times EXPOSIÇÃO. Tal como pode ser visto na figura 7, o efeito do DIA pode ser explicado pelo aumento da massa corporal das progenitoras do 1º ao 15º dia do período pós-natal, seguido de uma redução até o 30º dia pós-natal (PN30). Tendo em vista a ausência de efeito ou interação com o fator EXPOSIÇÃO, verifica-se que o ambiente enriquecido não foi capaz de interferir com a evolução destes valores ao longo do período indicado.

Figura 7 – Evolução da massa corporal: progenitoras



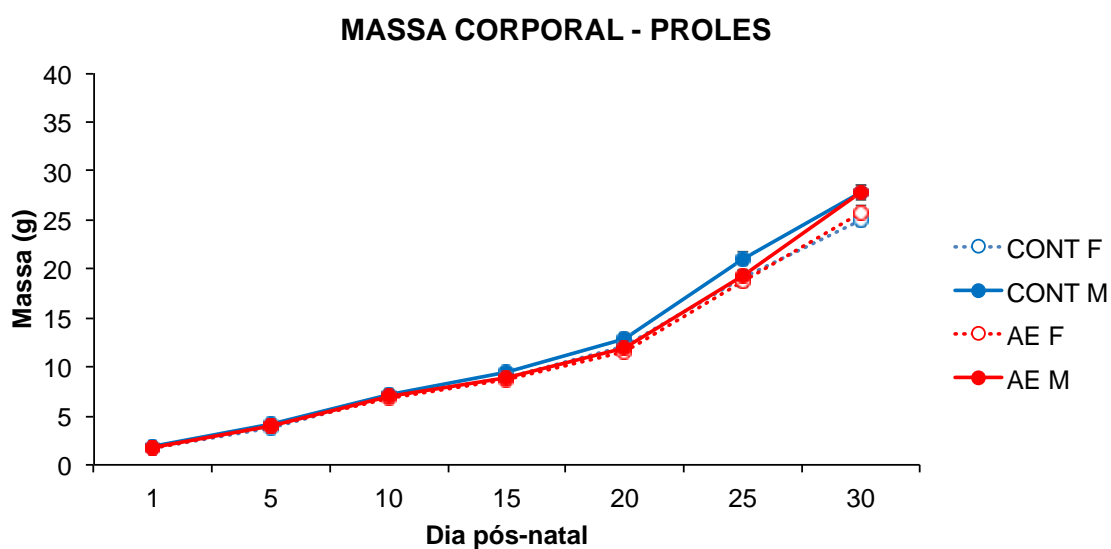
Legenda: Evolução da massa corporal das progenitoras de PN1 a PN30; CONT: animais expostos ao ambiente padrão; AE: animais expostos ao ambiente enriquecido. n = 13 ninhadas por grupo. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2017.

3.1.2. Filhotes

A ANOVA para os dados de massa corporal dos filhotes indicou um efeito do DIA ($F = 2525$; $gl = 2,5$; $P < 0,001$), do SEXO ($F = 5,0$; $gl = 1$; $P = 0,031$) e uma interação DIA \times SEXO ($F = 6,1$; $gl = 2,5$; $P = 0,001$), não sendo observados efeito ou interação com o fator EXPOSIÇÃO. Tal como pode ser visto na figura 8, o efeito do DIA pode ser explicado pelo aumento progressivo da massa corporal dos filhotes do 1º ao 30º dia pós-natal (FPLSD: todas as comparações par a par com $P < 0,05$). Considerando-se a interação entre o DIA e o SEXO, uma ANOVA multivariada foi utilizada para verificar o efeito do SEXO na massa corporal dos filhotes em cada um dos dias em que esta foi aferida: diferença significativa entre machos ($27,8 \pm 0,5$ g) e fêmeas ($25,4 \pm 0,5$ g) somente foi observada em PN30 ($F = 12,3$; $gl = 1$; $P = 0,001$). Tendo em vista a ausência de efeito ou interação com o fator EXPOSIÇÃO, verifica-se que o ambiente enriquecido não foi capaz de interferir com a evolução destes valores ao longo do período indicado.

Figura 8 – Evolução da massa corporal: filhotes



Legenda: Evolução da massa corporal das progenitoras de PN1 a PN30; CONT: animais expostos ao ambiente padrão; AE: animais expostos ao ambiente enriquecido; M: machos; F: fêmeas. $n = 13$ ninhadas por grupo. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2017.

3.2. Testes comportamentais

3.2.1. Campo Aberto

3.2.1.1. *Entradas Totais*

A ANOVA global para a variável Entradas Totais indicou que as seguintes interações eram significativas: SEXO \times TRATAMENTO ($F = 12,6$; $gl = 1$; $P = 0,001$), IDADE \times SEXO \times EXPOSIÇÃO ($F = 2,8$; $gl = 1$; $P = 0,099$), SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 7,9$; $gl = 1$; $P = 0,006$). Tendo em vista as interações envolvendo a idade e o sexo dos animais, as análises prosseguiram separadamente por idade e sexo, sendo este procedimento utilizado na análise de todas as demais variáveis obtidas no campo aberto, quando apropriado. Os dados segmentados por idade e sexo são apresentados na figura 11.

Com relação aos animais testados durante a adolescência (PN45), observamos um efeito significativo da EXPOSIÇÃO ($F = 6,5$; $gl = 1$; $P = 0,016$) nas fêmeas (Figura 9A). Nestas, as expostas previamente ao ambiente enriquecido apresentaram um maior número de entradas do que as do ambiente controle, resultado este que não foi afetado pelo tratamento com nicotina. Ainda para as fêmeas, a ANOVA de menor ordem com GRUPO como fator indicou efeito significativo ($F = 3,0$; $gl = 3$; $P = 0,047$) (Figura 11A): as análises par a par indicaram que as fêmeas expostas ao ambiente enriquecido e tratadas com salina (AE+SAL) apresentavam um maior número de entradas do que as fêmeas expostas ao ambiente controle e tratadas com salina (CONT+SAL; $P = 0,043$) ou com nicotina (CONT+NIC; $P = 0,008$). Já para os machos adolescentes (Figura 11A), observamos uma interação EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO significativa ($F = 6,7$; $gl = 1$; $P = 0,015$). As comparações par a par indicaram que: 1) a exposição ao ambiente enriquecido levava a uma redução no número de entradas nos animais AE+SAL quando comparados aos animais CONT+SAL; 2) que o tratamento com nicotina nos animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina (AE+NIC) aumentava o número de entradas quando comparadas as dos animais AE+SAL, tornando-o, de fato, similar ao do grupo CONT+SAL.

Entre os adultos (PN75), verificou-se um efeito do TRATAMENTO ($F = 8,7$; $gl = 1$; $P = 0,006$) nos machos (Figura 10A): os animais tratados com nicotina apresentaram um

número maior de entradas totais do que os animais tratados com salina. A ANOVA de menor ordem com GRUPO como fator indicou um efeito significativo ($F = 3,6$; $gl = 3$; $P = 0,026$) (Figura 11B): tal como ocorreu com os machos adolescentes, os animais AE+NIC apresentaram um aumento no número de entradas quando comparados aos animais AE+SAL ($P = 0,006$). Neste caso, porém, não houve diferença entre os grupos CONT+SAL e AE+SAL, e o resultado do grupo AE+NIC foi também maior do que os do grupo CONT+SAL ($P = 0,015$). Nenhum efeito ou interação foi observada para as fêmeas adultas.

3.2.1.2. Entradas Centro

A ANOVA global para a variável Entradas Centro indicou efeito significativo do SEXO ($F = 5,3$; $gl = 1$; $P = 0,023$) e que as seguintes interações eram significativas: SEXO \times TRATAMENTO ($F = 4,5$; $gl = 1$; $P = 0,037$), SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 3,9$; $gl = 1$; $P = 0,051$). Os dados segmentados por idade e sexo são apresentados na figura 12.

Após a separação pelo sexo, a ANOVA (que não considerou o fator IDADE) indicou um efeito do TRATAMENTO ($F = 5,2$; $gl = 1$; $P = 0,026$) somente para os machos: o tratamento com nicotina ($15,8 \pm 1,1$) levou a um aumento no número de entradas quanto comparado ao feito com salina ($12,6 \pm 0,9$).

3.2.1.3. Entradas Borda

A ANOVA global para a variável Entradas Borda não indicou efeitos significativos, porém indicou as seguintes interações significativas: SEXO \times TRATAMENTO ($F = 12,5$; $gl = 1$; $P = 0,001$), IDADE \times SEXO \times TRATAMENTO ($F = 3,6$; $gl = 1$; $P = 0,06$), SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 8,1$; $gl = 1$; $P = 0,005$). Os dados segmentados por idade e sexo são apresentados na figura 12.

Com relação aos animais testados na adolescência, observamos um efeito significativo da EXPOSIÇÃO ($F = 6,8$; $gl = 1$; $P = 0,015$) nas fêmeas (Figura 9B): tal como indicado anteriormente para as Entradas Totais, as fêmeas AE apresentaram um número maior de

Entradas Borda do que as CONT. Já para os machos adolescentes (Figura 12B), observamos uma interação significativa EXPOSIÇÃO × TRATAMENTO ($F = 8,1$; $gl = 1$; $P = 0,008$). As comparações par a par indicaram que o grupo AE-SAL apresentava valores significativamente menores do que os grupos CONT-SAL ($P = 0,024$) e AE-NIC ($P = 0,023$).

Nos machos adultos, verificou-se um efeito do TRATAMENTO ($F = 10,5$; $gl = 1$; $P = 0,003$) (Figura 10B), sendo que animais NIC apresentaram resultados maiores do que os SAL. A ANOVA de menor ordem com GRUPO como fator indicou um efeito significativo ($F = 4,1$; $gl = 3$; $P = 0,016$) (Figura 12D): os animais AE+NIC apresentaram um aumento no número de entradas quando comparados aos animais CONT+SAL ($P = 0,017$) e AE+SAL ($P = 0,004$). Adicionalmente, o grupo AE+SAL apresentou valor menor do que o CONT+NIC ($P = 0,049$). Nenhum efeito ou interação foi observada para as fêmeas adultas.

3.2.1.4. %Entradas Centro

A ANOVA global para a variável %Entradas Centro indicou a seguinte interação significativa: IDADE × SEXO × TRATAMENTO ($F = 3,4$; $gl = 1$; $P = 0,069$) Os dados segmentados por idade e sexo são apresentados na figura 11. Não foram observados efeitos ou interações nas análises de menor ordem.

3.2.1.5. Tempo Centro

A ANOVA global para a variável Tempo Centro indicou os seguintes efeitos significativos: IDADE ($F = 6,7$; $gl = 1$; $P = 0,011$), SEXO ($F = 5,3$; $gl = 1$; $P = 0,023$). Os dados segmentados por idade e sexo são apresentados na figura 13.

Com relação aos animais testados na adolescência, observamos uma interação EXPOSIÇÃO × TRATAMENTO ($F = 4,0$; $gl = 1$; $P = 0,054$) nos machos. Após a subdivisão da análise pelo fator EXPOSIÇÃO, verificamos que somente nos animais expostos ao ambiente controle podia-se observar um efeito do TRATAMENTO ($F = 5,0$; $gl = 1$; $P = 0,042$) (Figura 10C): os animais NIC permaneceram mais tempo no centro do campo aberto do que os animais SAL. Nenhum efeito ou interação foi observada para as fêmeas

adolescentes. Para os animais adultos, não foram observados efeitos ou interações em ambos os sexos.

3.2.1.6. Autolimpezas

A ANOVA global para a Autolimpezas indicou os seguintes efeitos significativos: EXPOSIÇÃO ($F = 10,8$; $gl = 1$; $P = 0,001$), SEXO ($F = 5,1$; $gl = 1$; $P = 0,027$). A interação IDADE \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO também foi significativa ($F = 6,2$; $gl = 1$; $P = 0,014$). Os dados segmentados por idade e sexo são apresentados na figura 14.

Com relação aos animais testados na adolescência, observamos um efeito da EXPOSIÇÃO ($F = 8,1$; $gl = 1$; $P = 0,008$) (Figura 9C): as fêmeas AE apresentaram um número maior de evento de autolimpeza do que as CONT. Também observamos uma interação EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 3,1$; $gl = 1$; $P = 0,09$) nestas fêmeas. Após a subdivisão da análise pelo fator EXPOSIÇÃO, não foi verificado efeito significativo do TRATAMENTO nas fêmeas CONT ou AE. Nenhum efeito ou interação foi observada para os machos adolescentes. Para os animais adultos, não foram observados efeitos ou interações em ambos os sexos.

3.2.1.7. Levantamentos

A ANOVA global para a variável Levantamentos não indicou efeitos significativos, porém as seguintes interações significativas foram indicadas: SEXO \times TRATAMENTO ($F = 10,5$; $gl = 1$; $P = 0,002$), IDADE \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 3,0$; $gl = 1$; $P = 0,088$), SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 16,0$; $gl = 1$; $P < 0,000$). Os dados segmentados por idade e sexo são apresentados na figura 14.

Com relação aos animais testados na adolescência, observamos uma interação EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 20,0$; $gl = 1$; $P < 0,001$) nos machos (Figura 14B). As comparações par a par indicaram que: 1) os animais AE+NIC apresentavam mais eventos de levantamento nas patas traseiras do que os animais CONT+NIC ($P = 0,042$) e AE+SAL ($P < 0,001$); 2) o grupo AE+SAL também apresentava menos eventos do que os grupo

CONT+SAL ($P < 0,001$) e CONT+NIC ($P < 0,042$). Nenhum efeito ou interação foi observada para as fêmeas adolescentes.

Para os animais adultos, observamos um efeito de TRATAMENTO ($F = 4,7$; $gl = 1$; $P = 0,039$) somente nos machos (Figura 10D): os animais NIC apresentaram mais eventos de levantamento nas patas traseiras do que os animais SAL. Nenhum efeito ou interação foi observada para as fêmeas adultas.

3.2.1.8. Correlações entre os dados do campo aberto

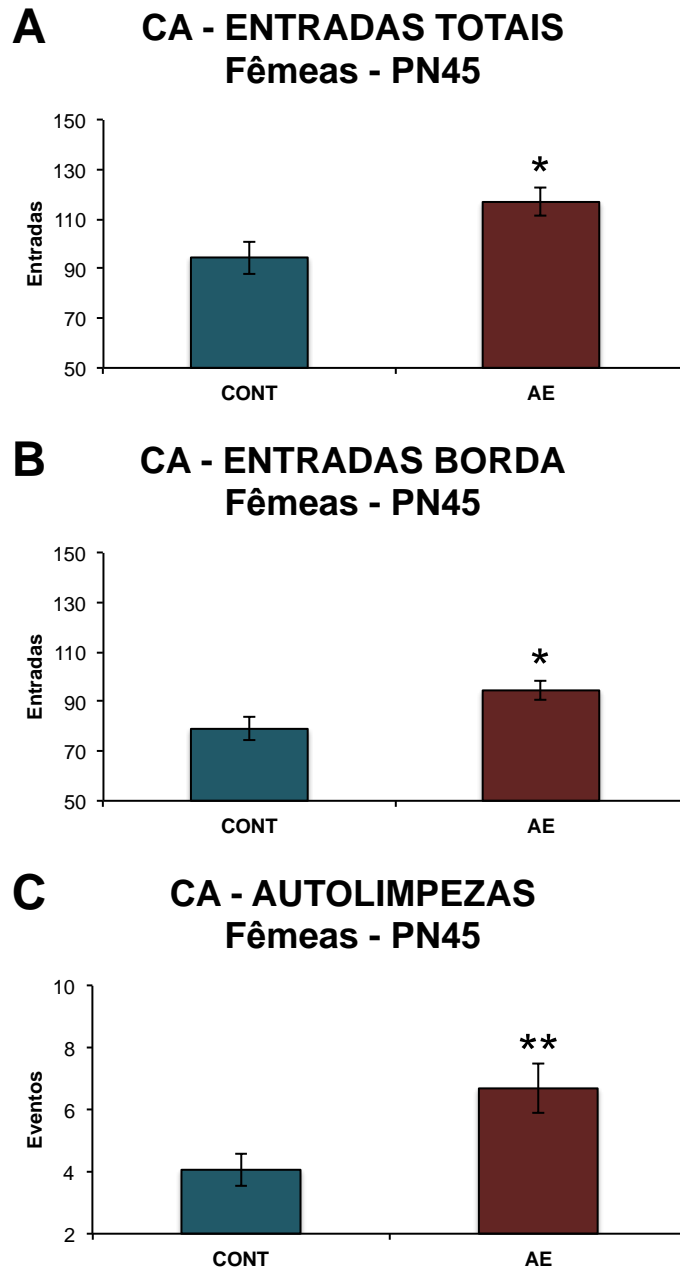
Para o estudo do grau de associação entre as variáveis avaliadas no campo aberto foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson (Quadro 1).

Quadro 1 – Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis do campo aberto

Correlações entre as variáveis do campo aberto						
	Entradas totais	Entradas centro	Entradas borda	%Entradas centro	Tempo centro	Auto-limpeza
Levantamento	0,69***	0,50***	0,65***	0,30***	0,09	0,09
Auto-limpeza	0,18*	0,32***	0,09	0,25**	0,19*	
Tempo centro	0,11	0,55***	-0,08	0,65***		
%Entradas centro	0,32***	0,88***	0,05			
Entradas borda	0,96***	0,43***				
Entradas centro	0,67***					

* = $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

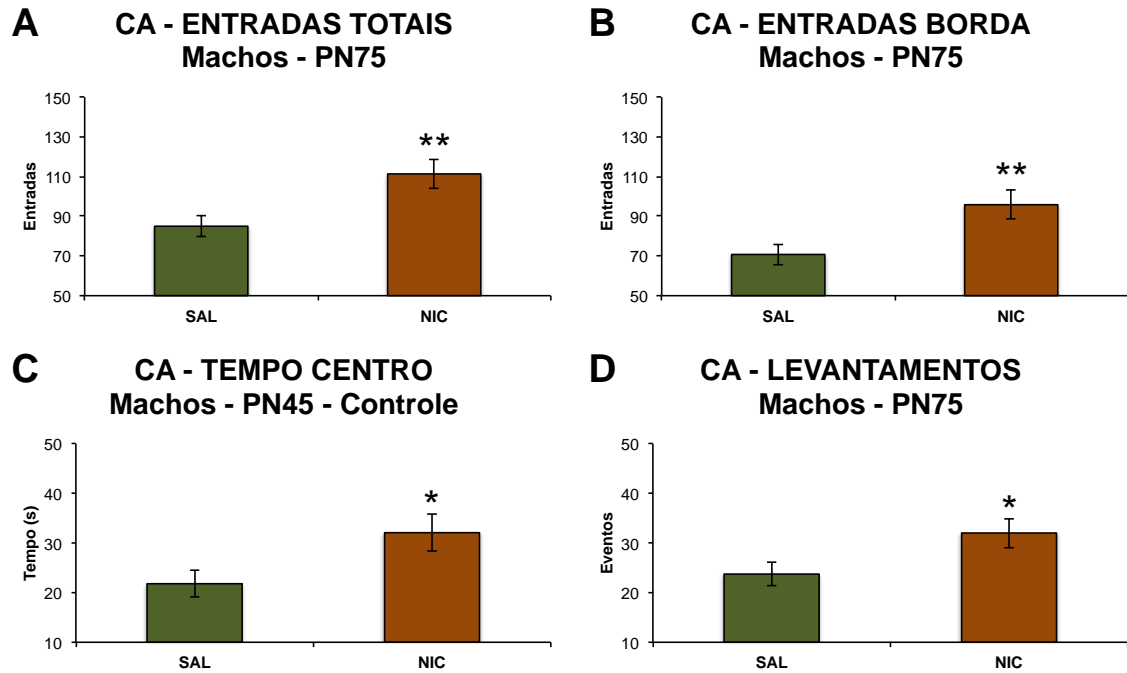
Figura 9 – Campo Aberto: efeitos da exposição



Legenda: Dados referentes aos efeitos do tratamento em comportamentos apresentados no campo aberto (CA). O número total (A) e na borda (B) de entradas aumentaram em resposta à exposição ao ambiente enriquecido nas fêmeas PN45, sem que o resultado fosse afetado pelo tratamento ou não com nicotina. Também nas fêmeas PN45 observou-se um aumento na ocorrência de eventos de levantamento (C) em função da exposição ao ambiente enriquecido, sem que este resultado dependesse do tratamento ou não com nicotina. CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média ± EPM. * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

Fonte: A autora, 2017.

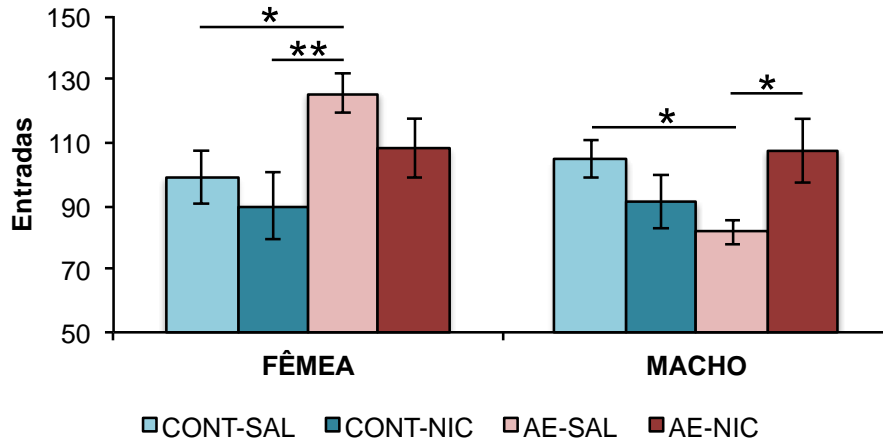
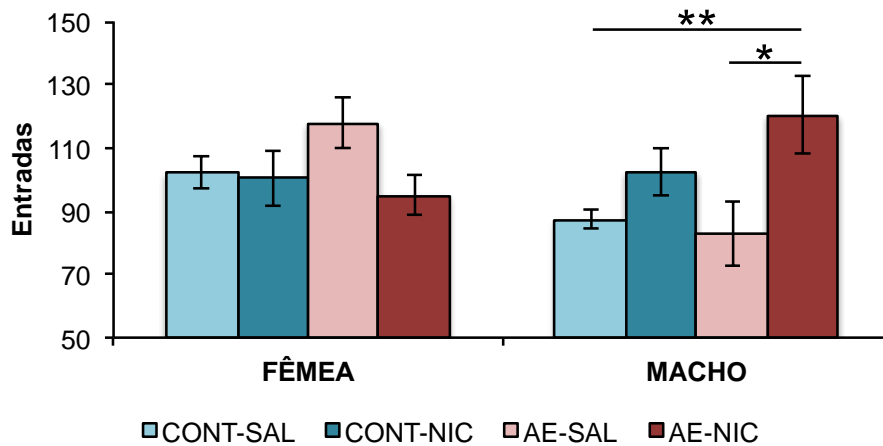
Figura 10 – Campo Aberto: efeitos do tratamento



Legenda: Dados referentes aos efeitos do tratamento em comportamentos apresentados no campo aberto (CA). O número total (A) e na borda (B) de entradas aumentaram em resposta ao tratamento com nicotina nos machos PN75, sem que o resultado fosse afetado pela exposição ou não ao ambiente enriquecido. Por sua vez, em machos PN45 (C), ocorreu um aumento no tempo dispendido no centro do campo nos animais expostos ao ambiente controle e tratados com nicotina em comparação aos tratados com salina. O tratamento com nicotina também aumentou o número de levantamentos (D) nos machos PN75, sem que o resultado fosse afetado pela exposição ou não ao ambiente enriquecido. CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média ± EPM. * = P < 0,05, ** = P < 0,01.

Fonte: A autora, 2017.

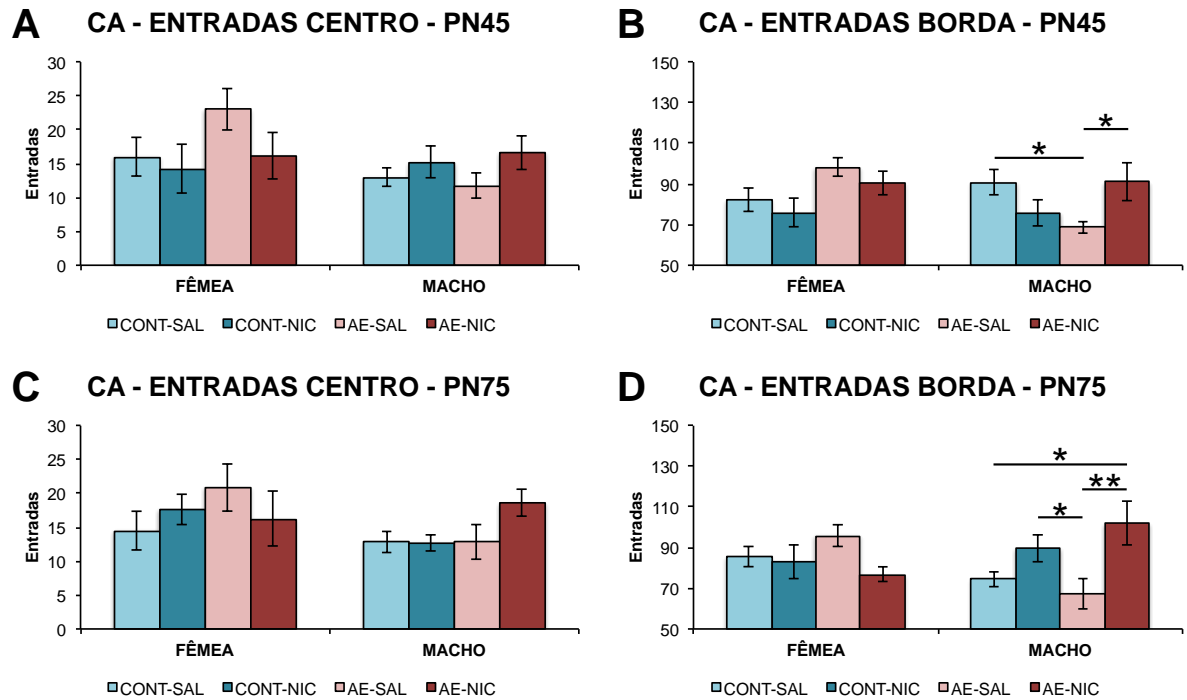
Figura 11 – Campo Aberto: total de entradas realizadas

A CA - ENTRADAS TOTAIS - PN45**B CA - ENTRADAS TOTAIS - PN75**

Legenda: Dados referentes ao número total de entradas no campo aberto (CA) em PN45 (A) e PN75 (B). CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média ± EPM. * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

Fonte: A autora, 2017.

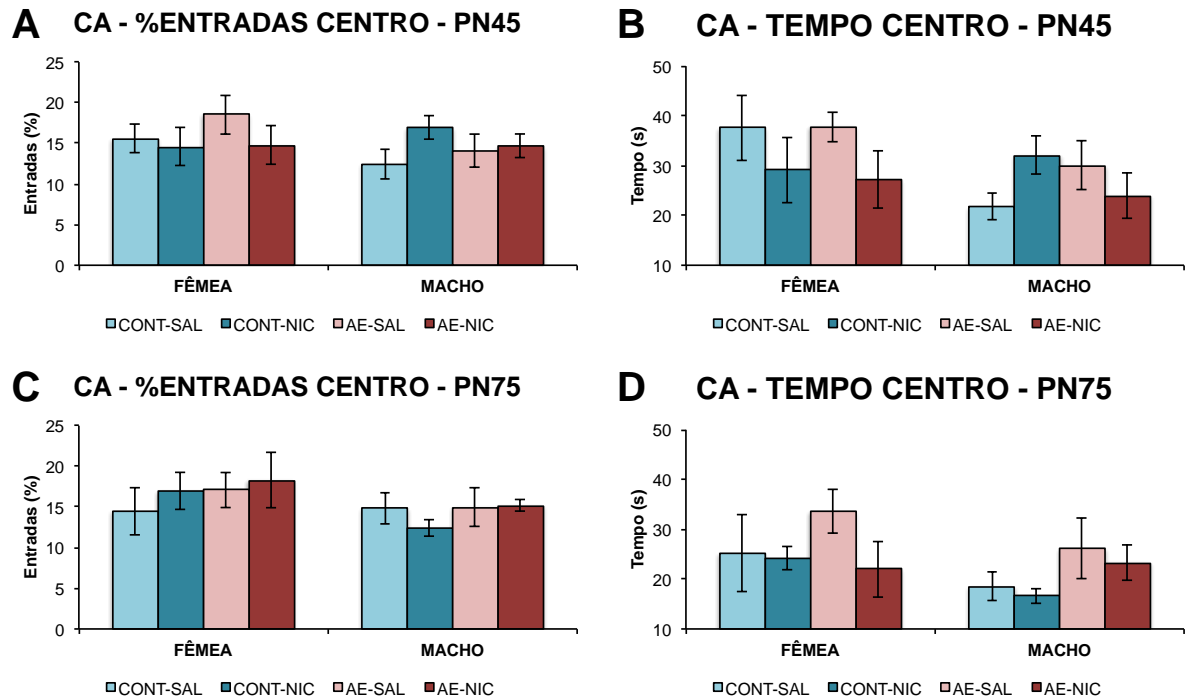
Figura 12 – Campo Aberto: número de entradas no centro e na borda



Legenda: Dados referentes ao número de entradas no centro (A e C) e na borda (B e D) no campo aberto (CA) em PN45 (A e B) e PN75 (C e D). CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

Fonte: A autora, 2017.

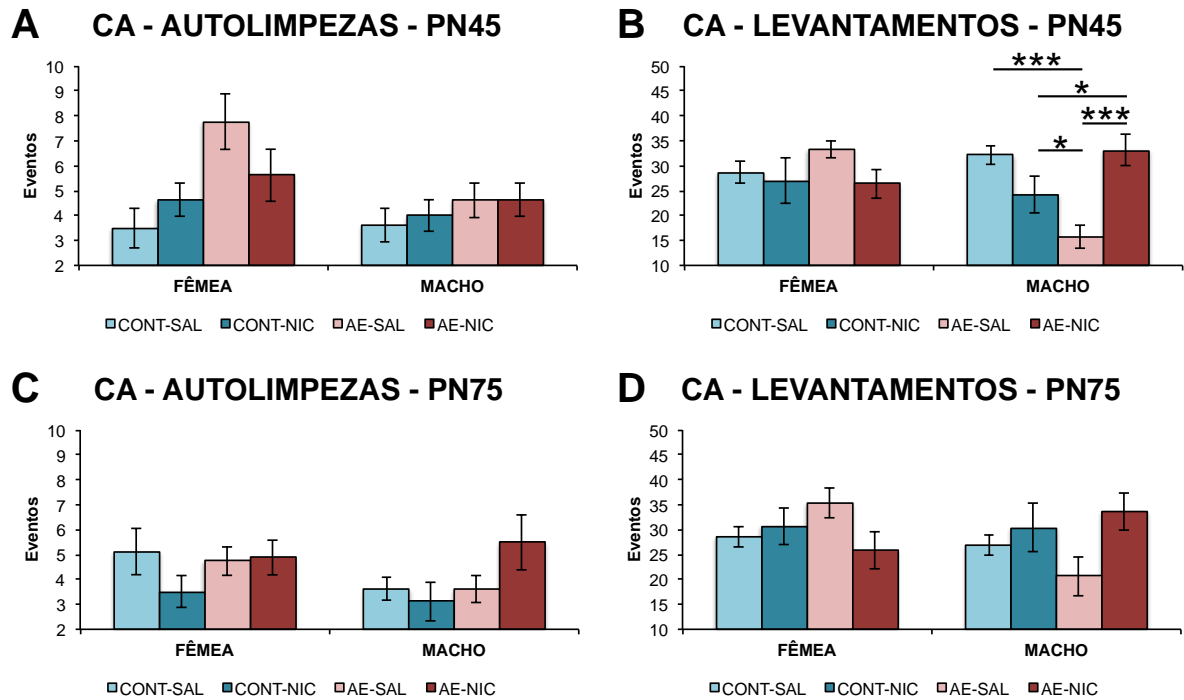
Figura 13 – Campo Aberto: % de entradas no centro e tempo dispendido no centro



Legenda: Dados referentes ao percentual de entradas (A e C) e ao percentual de tempo dispendido (B e D) no centro do campo aberto (CA) em PN45 (A e B) e PN75 (C e D). CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 14 – Campo Aberto: número de eventos de autolimpeza e levantamento



Legenda: Dados referentes ao número de eventos de autolimpeza (A e C) e levantamentos (B e D) no campo aberto (CA) em PN45 (A e B) e PN75 (C e D). CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.

Fonte: A autora, 2017.

3.2.2. Campo Vazado

3.2.2.1. Orifícios Totais

A ANOVA global para a variável Orifícios Totais indicou um efeito significativo da IDADE ($F = 10,9$; $gl = 1$; $P = 0,001$) e as seguintes interações significativas: IDADE \times SEXO \times TRATAMENTO ($F = 4,5$; $gl = 1$; $P = 0,036$), SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 7,8$; $gl = 1$; $P = 0,006$), IDADE \times SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 6,9$; $gl = 1$; $P = 0,01$). Tendo em vista as interações envolvendo a idade e o sexo dos animais, as análises prosseguiram separadamente por idade e sexo, sendo este procedimento utilizado na análise de todas as demais variáveis obtidas no campo aberto, quando apropriado. Os dados são apresentados na figura 16.

Com relação aos animais testados na adolescência, não foram observados efeitos ou interações significativas em ambos os sexos (Figura 16A). Para os animais testados na idade adulta, observamos um efeito significativo do TRATAMENTO ($F = 5,1$; $gl = 1$; $P = 0,031$): tal como indicado na figura 15A, as fêmeas que receberam nicotina exploraram um número maior de orifícios do que as fêmeas que receberam salina. Também observamos uma interação EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO significativa ($F = 10,7$; $gl = 1$; $P = 0,003$) nas fêmeas adultas (Figura 16B): as expostas ao ambiente controle e tratadas com nicotina (grupo CONT-NIC) apresentaram um aumento no número de orifícios explorados em comparação às tratadas com salina (CONT-SAL). Verificamos ainda que o grupo CONT-NIC apresentou um aumento na exploração dos orifícios também em relação às expostas ao ambiente enriquecido e tratadas com nicotina (AE+NIC). Com relação aos machos adultos (Figura 16B), também encontramos uma interação EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO significativa ($F = 12,0$; $gl = 1$; $P = 0,002$): os animais CONT-NIC ($P = 0,021$) e AE-SAL ($P = 0,001$) apresentaram uma diminuição significativa no número de orifícios explorados em comparação ao grupo CONT-SAL. Adicionalmente, o grupo AE-SAL apresentou um número menor ($P = 0,034$) de explorações quando comparado ao grupo AE-NIC.

3.2.2.2. Orifícios Centro

A ANOVA global para a variável Orifícios Centro indicou um efeito significativo da IDADE ($F = 6,8$; $gl = 1$; $P = 0,01$). Os dados são apresentados na figura 17. Após a divisão da análise em função deste fator, não foram observados efeitos ou interações nas ANOVAs de menor ordem.

3.2.2.3. Orifícios Borda

A ANOVA global para a variável Orifícios Borda indicou um efeito significativo da IDADE ($F = 9,8$; $gl = 1$; $P = 0,002$) e as seguintes interações significativas: IDADE \times EXPOSIÇÃO ($F = 2,9$; $gl = 1$; $P = 0,089$), IDADE \times SEXO \times TRATAMENTO ($F = 4,0$; $gl = 1$; $P = 0,047$), SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 8,1$; $gl = 1$; $P = 0,005$), IDADE \times SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 7,5$; $gl = 1$; $P = 0,007$). Os dados são apresentados na figura 17.

Com relação aos animais testados na adolescência, não foram observados efeitos ou interações significativas em ambos os sexos (Figura 17B). Para os animais adultos, nas fêmeas observamos um efeito significativo do TRATAMENTO ($F = 4,4$; $gl = 1$; $P = 0,045$) (Figura 15B): tal como observado para a variável Orifícios Totais, o número de orifícios explorados na borda foi maior nas que foram tratadas com nicotina do que nas que foram tratadas com salina. Também observamos uma interação significativa EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 10,5$; $gl = 1$; $P = 0,003$) nestas fêmeas adultas (Figura 17D): as CONT-NIC apresentaram um número maior de orifícios explorados na borda em comparação aos grupos CONT-SAL ($P = 0,009$) e AE-NIC ($P = 0,033$). Com relação aos machos adultos, identificamos primeiramente um efeito significativo da EXPOSIÇÃO ($F = 4,8$; $gl = 1$; $P = 0,038$) (Figura 15C): os animais expostos ao ambiente enriquecido exploraram mais orifícios na borda dos que os expostos ao ambiente controle. Adicionalmente, nos machos adultos observamos uma interação significativa EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 12,1$; $gl = 1$; $P = 0,002$) (Figura 17D). As análises par a par indicaram que os grupos CONT-NIC ($P = 0,017$) e AE-SAL ($P < 0,001$) apresentaram uma diminuição significativa em comparação ao grupo CONT-SAL. E observamos ainda que o grupo AE-NIC apresentou um aumento ($P =$

0,027) no número de orifícios explorados na borda quando comparado ao grupo AE-SAL.

3.2.2.4. Tempo Centro e Tempo Borda

Tendo em vista que os dados de tempo dispendido no centro são complementares ao tempo dispendido na borda, as análises apresentadas a seguir são iguais para ambas as variáveis, embora o Tempo Centro var ser utilizado aqui para expressar o resultado das comparações estatísticas. A ANOVA global para a variável Tempo Centro indicou efeito significativo do SEXO ($F = 4,2$; $gl = 1$; $P = 0,044$) e as seguintes interações significativas: IDADE \times SEXO \times TRATAMENTO ($F = 5,0$; $gl = 1$; $P = 0,027$) e SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 4,6$; $gl = 1$; $P = 0,035$). Os dados são apresentados na figura 18. Não foram observados efeitos ou interações nas ANOVAs de menor ordem.

3.2.2.5. Autolimpezas

A ANOVA global para a variável Autolimpeza indicou efeitos significativos da IDADE ($F = 44,2$; $gl = 1$; $P < 0,001$) e do SEXO ($F = 12,1$; $gl = 1$; $P = 0,001$) e a seguinte interação significativa: SEXO \times EXPOSIÇÃO ($F = 5,2$; $gl = 1$; $P = 0,024$). Os dados são apresentados na figura 19. Não foram observados efeitos ou interações nas ANOVAs de menor ordem.

3.2.2.6. Levantamentos

A ANOVA global para a variável Levantamento indicou efeito significativo do SEXO ($F = 4,7$; $gl = 1$; $P = 0,032$) e a seguinte interação significativa: SEXO \times TRATAMENTO ($F = 4,9$; $gl = 1$; $P = 0,03$). Os dados são apresentados na figura 19. Após a separação da análise pelo SEXO (excluindo-se o fator EXPOSIÇÃO), verificou-se um efeito significativo de TRATAMENTO ($F = 10,5$; $gl = 1$; $P = 0,002$) somente nos machos: os que receberam nicotina ($15,2 \pm 1,1$) apresentaram um numero maior de eventos do que os que receberam

salina ($10,6 \pm 0,9$).

3.2.2.7. Correlações entre os dados do campo vazado

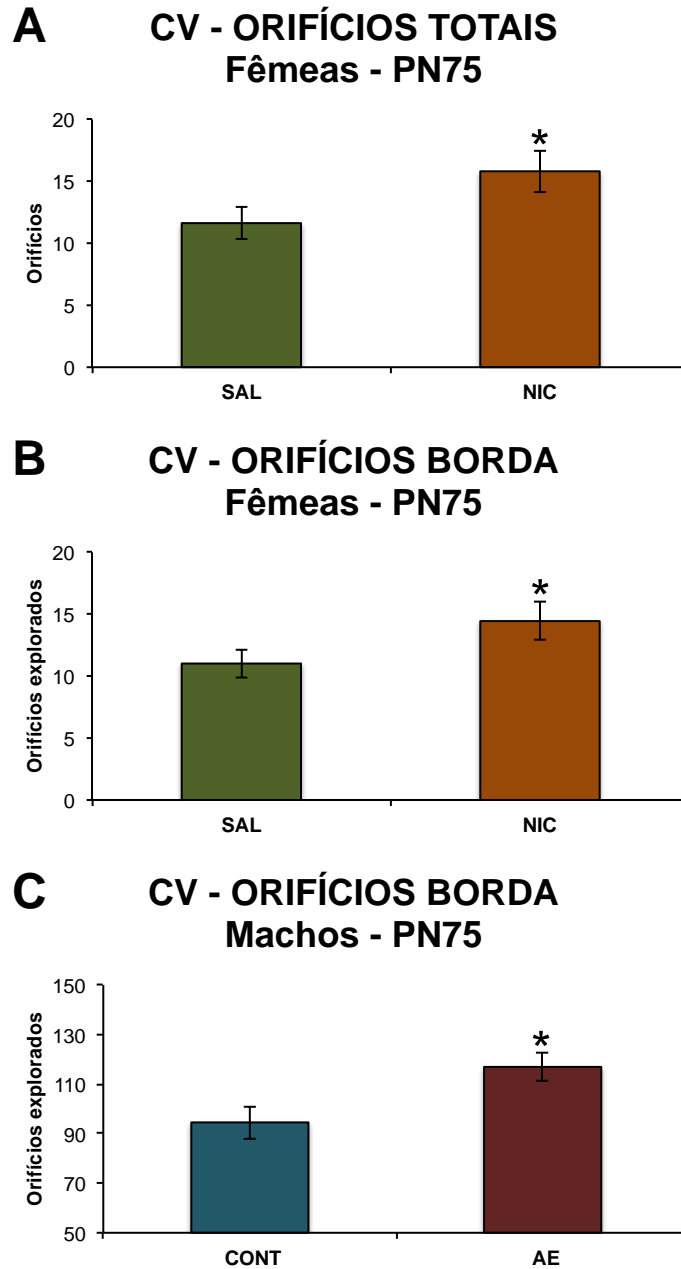
Para o estudo do grau de associação entre as variáveis avaliadas no campo vazado foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson (Quadro 2).

Quadro 2 – Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis do campo vazado

Correlações entre as variáveis do campo vazado						
	Orifícios Totais	Orifícios Centro	Orifícios Borda	Tempo Centro	Tempo Borda	Auto-limpeza
Levantamento	0,11	0,07	0,11	0,02	-0,02	-0,03
Auto-limpeza	-0,02	0,03	-0,03	0,02	-0,02	
Tempo Borda	-0,34***	-0,51***	0,28***	-1,00***		
Tempo Centro	0,34***	0,51***	0,28***			
Orifícios Borda	0,99***	0,64***				
Orifícios Centro	0,74***					

* = $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

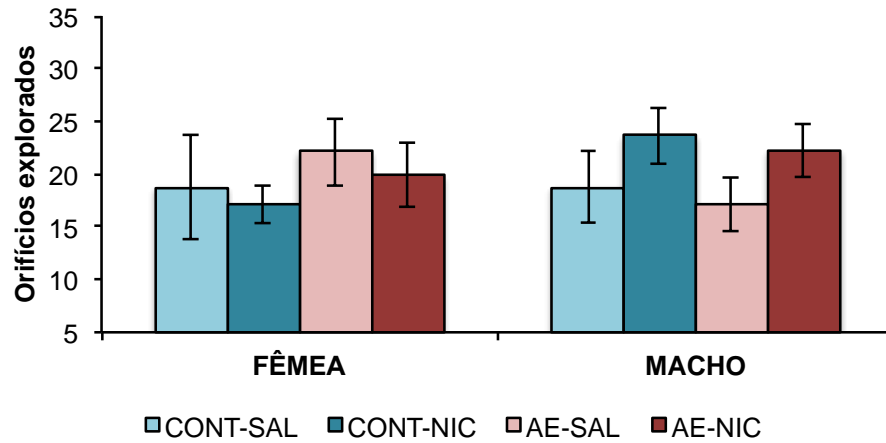
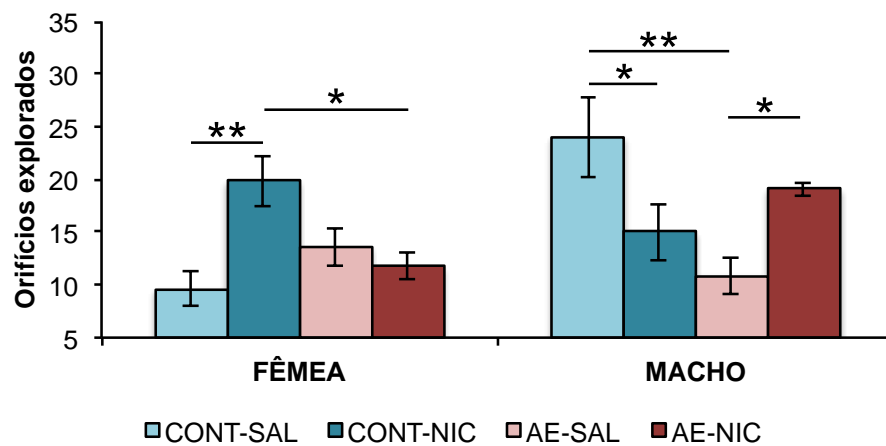
Figura 15 – Campo Vazado: efeitos da exposição e do tratamento no número de orifícios explorados



Legenda: Dados referentes ao número de orifícios explorados no campo vazado (CV). O número total (A) e na borda (B) aumentaram em resposta ao tratamento com nicotina nas fêmeas PN75, sem que o resultado fosse afetado pela exposição ou não ao ambiente enriquecido. Por sua vez, em machos PN75 (C), ocorreu um aumento no número de orifícios explorados na borda nos animais expostos ao ambiente enriquecido, sendo que o resultado não dependeu do tipo de tratamento recebido pelo animal. CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2017.

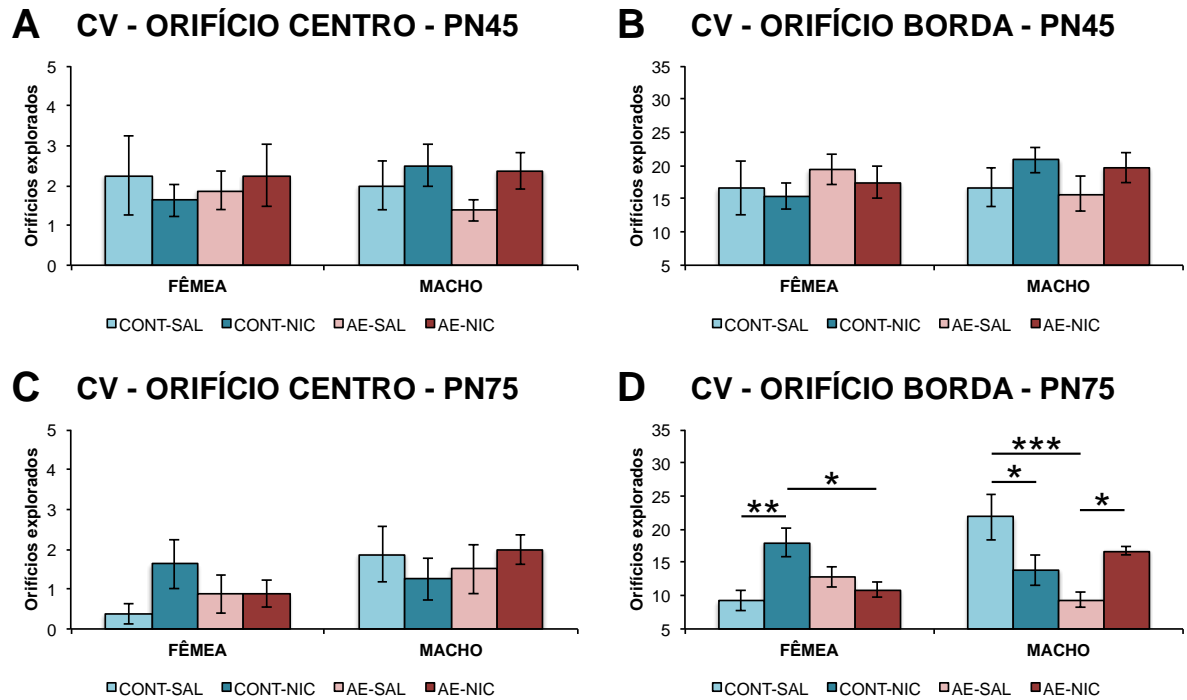
Figura 16 – Campo Vazado: total de orifícios explorados

A CV - ORIFÍCIOS TOTAIS - PN45**B CV - ORIFÍCIOS TOTAIS - PN75**

Legenda: Dados referentes ao número total de orifícios explorados no campo vazado (CV) em PN45 (A) e PN75 (B). CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média ± EPM. * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

Fonte: A autora, 2017.

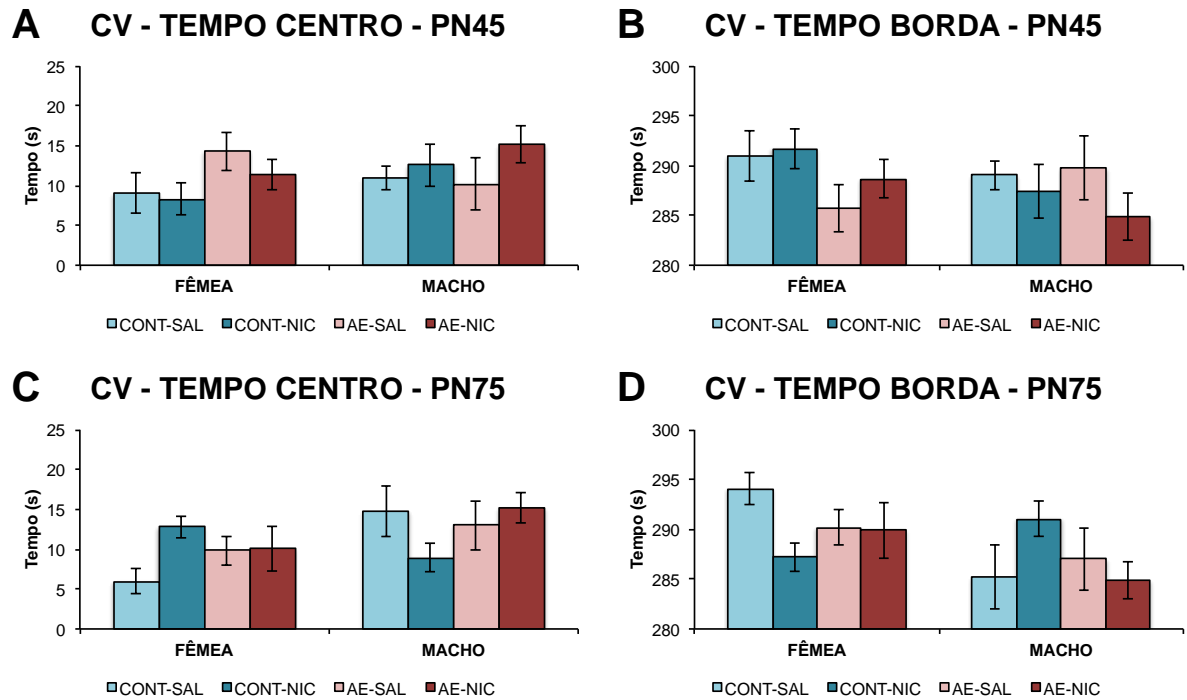
Figura 17 – Campo Vazado: número de orifícios explorados no centro e na borda



Legenda: Dados referentes ao número de orifícios explorados no centro (A e C) e na borda (B e D) do campo vazado (CV) em PN45 (A e B) e PN75 (C e D). CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

Fonte: A autora, 2017.

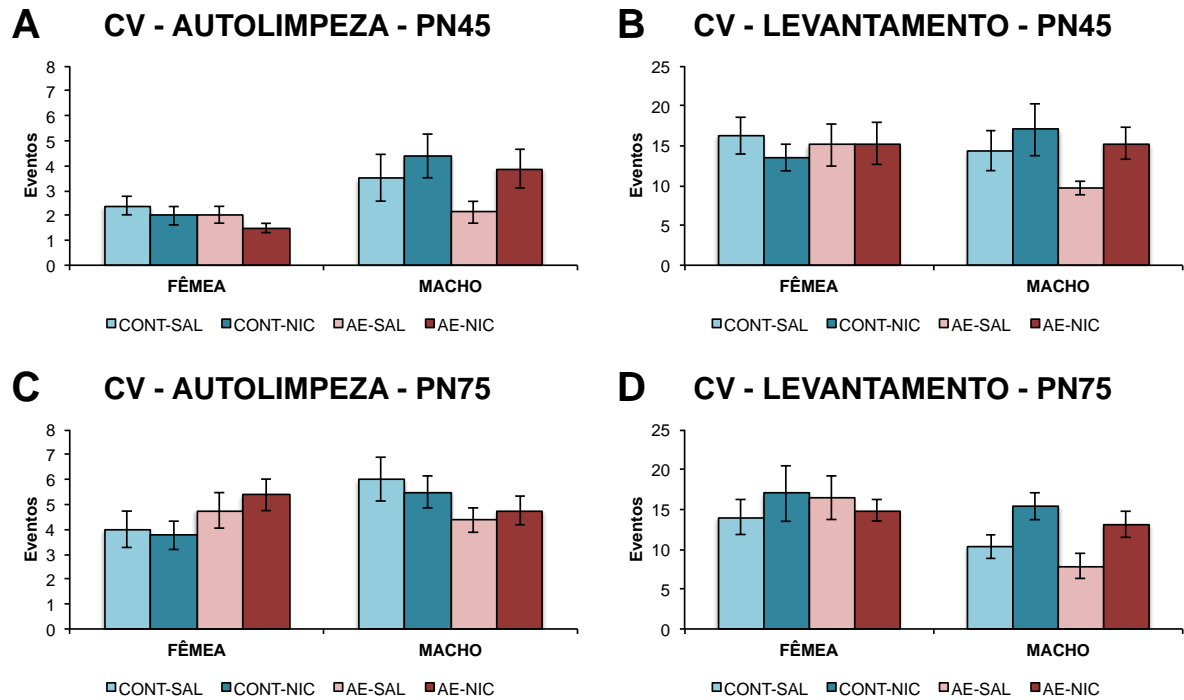
Figura 18 – Campo Vazado: tempo dispendido no centro e na borda



Legenda: Dados referentes ao tempo dispendido no centro (A e C) e na borda (B e D) do campo vazado (CV) em PN45 (A e B) e PN75 (C e D). CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 19 – Campo Vazado: número de eventos de autolimpeza e levantamento



Legenda: Dados referentes ao número de eventos de autolimpeza (A e C) e levantamentos (B e D) no campo vazado (CV) em PN45 (A e B) e PN75 (C e D). CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 10 ninhadas por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2017.

3.3. Análise Neuroquímica

3.3.1. Dopamina

A ANOVA global indicou efeitos significativos da IDADE ($F = 158$; $gl = 1$; $P < 0,001$), do SEXO ($F = 9,8$; $gl = 1$; $P = 0,002$) e da EXPOSIÇÃO ($F = 8,3$; $gl = 1$; $P = 0,005$), além de uma interação IDADE \times SEXO ($F = 4,2$; $gl = 1$; $P = 0,043$). Tendo em vista os efeitos e interações envolvendo a idade e o sexo dos animais, as análises prosseguiram com as análises referentes à exposição e ao tratamento separadas por sexo em cada idade, sendo os dados apresentados na figura 20. Nos animais adolescentes (PN45) não foram observados efeitos ou interação referentes aos fatores EXPOSIÇÃO e TRATAMENTO. Já nos animais adultos (PN75), foi observado um claro efeito da EXPOSIÇÃO ($F = 6,8$; $gl = 1$; $P = 0,019$)

restrito aos machos: animais expostos ao ambiente enriquecido, independentemente de terem sido tratados ou não com nicotina, apresentaram uma concentração de dopamina menor no córtex cerebral quando comparados aos animais expostos ao ambiente controle (padrão).

3.3.2. DOPAC

A ANOVA global indicou que as seguintes interações foram significativas: IDADE \times SEXO ($F = 4,1$; $gl = 1$; $P = 0,045$), IDADE \times TRATAMENTO ($F = 3,0$; $gl = 1$; $P = 0,088$), SEXO \times TRATAMENTO ($F = 4,1$; $gl = 1$; $P = 0,045$) e SEXO \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 2,9$; $gl = 1$; $P = 0,094$). Tendo em vista os efeitos e interações envolvendo a idade e o sexo dos animais, as análises prosseguiram com as análises referentes à exposição e ao tratamento separadas por sexo em cada idade, sendo os dados apresentados na figura 21. Tal como para a dopamina, não foram observados efeitos ou interação referentes aos fatores EXPOSIÇÃO e TRATAMENTO nos animais adolescentes. Nos animais machos adultos verificamos uma interação entre estes dois fatores ($F = 3,3$; $gl = 1$; $P = 0,087$) de forma que, após a separação da análise por cada exposição (ambiente controle ou ambiente enriquecido), notamos que o valor de DOPAC era significativamente menor ($P = 0,002$) no grupo tratado com nicotina quando comparado ao grupo tratado com salina.

3.3.3. Razão DOPAC/Dopamina

Para essa variável, a ANOVA global não indicou efeitos ou interações significativas, o que indica que a razão DOPAC/Dopamina não foi afetada pela idade, sexo, exposição ou tratamento (Figura 22).

3.3.4. Noradrenalina

A ANOVA global indicou efeito do SEXO ($F = 7,3$; $gl = 1$; $P = 0,008$) além de interações IDADE \times EXPOSIÇÃO ($F = 13,1$; $gl = 1$; $P = 0,001$) e IDADE \times EXPOSIÇÃO \times TRATAMENTO ($F = 3,1$; $gl = 1$; $P = 0,082$) significativas. Tendo em vista os efeitos e interações envolvendo a idade e o sexo dos animais, as análises prosseguiram com as análises referentes à exposição e ao tratamento separadas por sexo em cada idade, sendo os dados apresentados na figura 23. Mais uma vez, não foram observados efeitos ou interação referentes aos fatores EXPOSIÇÃO e TRATAMENTO nos animais adolescentes. Já para os animais adultos, tanto em fêmeas quanto em machos foi observado efeito significativo da EXPOSIÇÃO (Fêmeas: $F = 8,5$; $gl = 1$; $P = 0,01$. Machos: $F = 5,3$; $gl = 1$; $P = 0,035$): em ambos os sexos, animais expostos ao ambiente enriquecido apresentaram concentrações de noradrenalina maiores do que os animais expostos ao ambiente controle.

3.3.5. Correlações entre os dados neuroquímicos

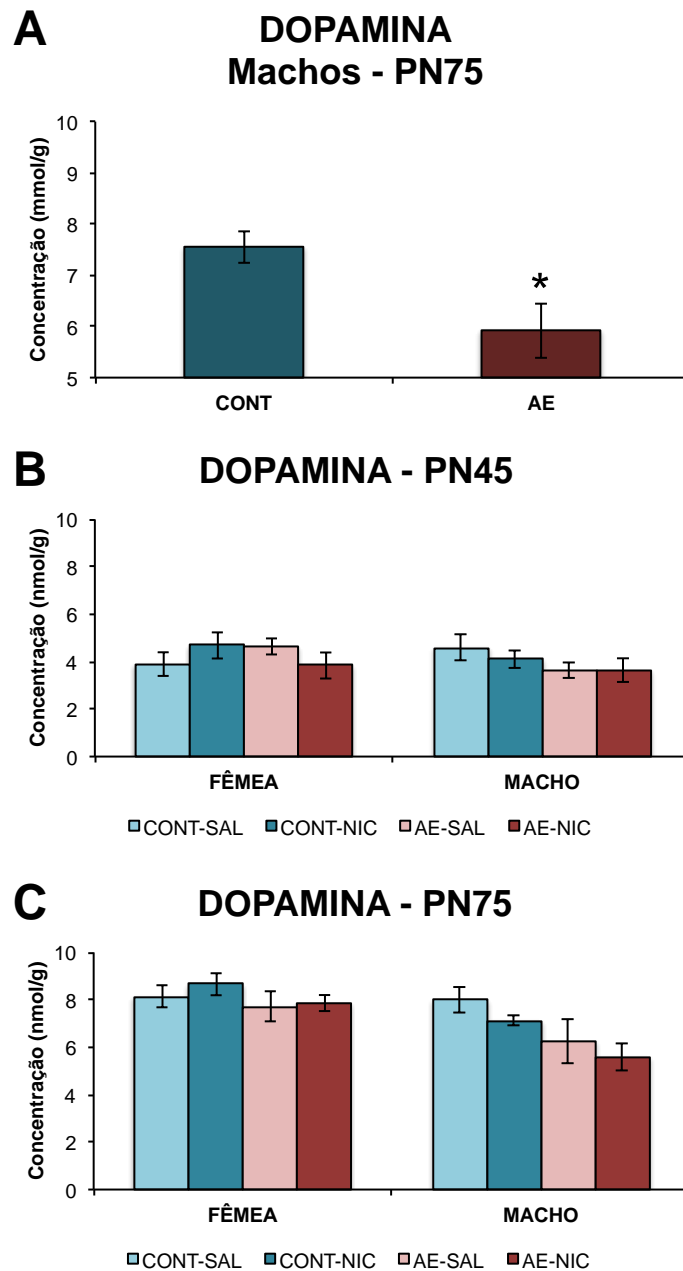
Para o estudo do grau de associação entre as variáveis neuroquímicas avaliadas foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson (Quadro 3)

Quadro 3 – Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis neuroquímicas

Correlações entre as variáveis neuroquímicas			
	DOPAMINA	DOPAC	DOPAM/DOPAC
NE	0,20*	0,26**	0,14
DOPAM/DOPAC	-0,71***	0,31***	
DOPAC	0,23**		

* = $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

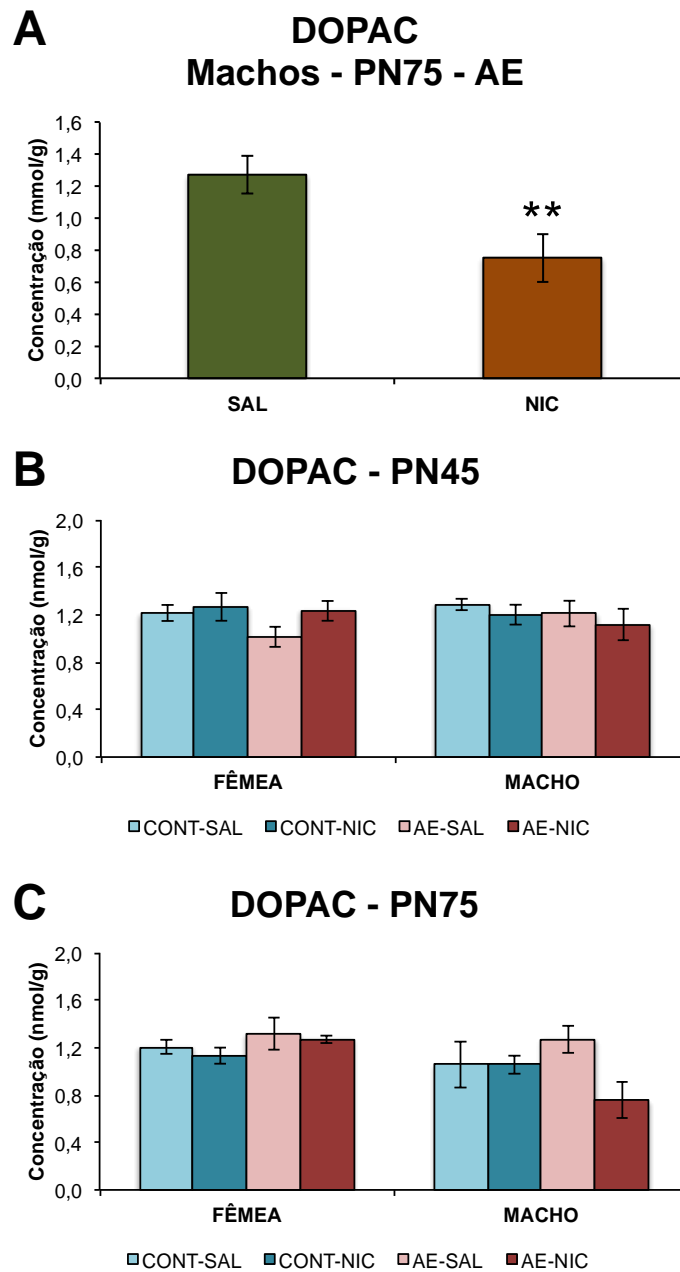
Figura 20 – Concentração de dopamina no córtex



Legenda: Dados da concentração de dopamina no córtex cerebral. Observou-se (A) que machos PN75 apresentavam concentração menor de dopamina nos animais que haviam sido expostos ao ambiente enriquecido, não sendo o resultado afetado pelo tratamento ou não com nicotina. Em (B) e (C) são apresentados, respectivamente, os dados de concentração de dopamina segmentados por sexo em PN45 e PN75. CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. $n = 7-9$ animais por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2017.

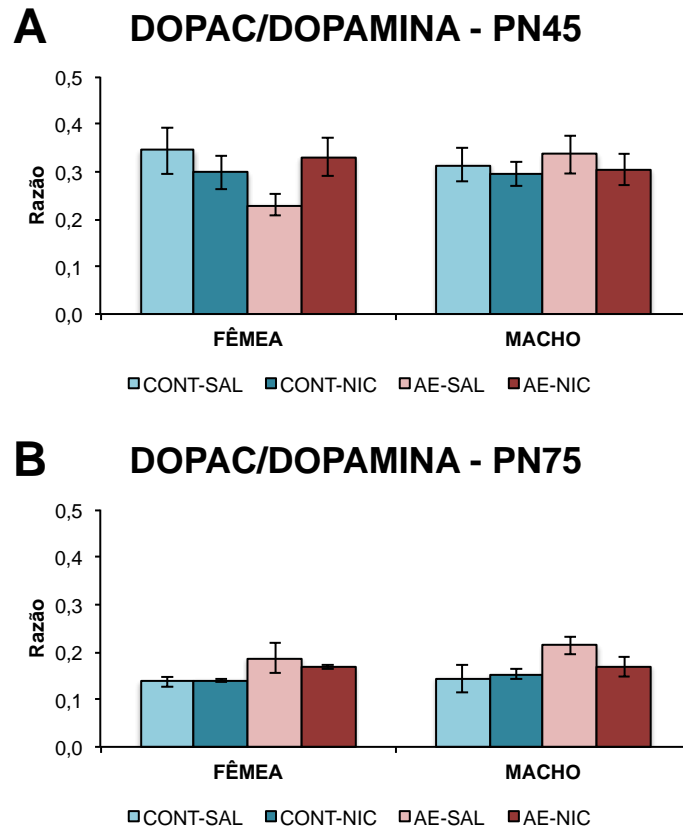
Figura 21 – Concentração de DOPAC no córtex



Legenda: Dados da concentração de DOPAC no córtex cerebral. Observou-se (A) que machos PN75 expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina apresentaram uma concentração de DOPAC menor do que os tratados com salina. Em (B) e (C) são apresentados, respectivamente, os dados de concentração de DOPAC segmentados por sexo em PN45 e PN75. CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. $n = 7-9$ animais por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2017.

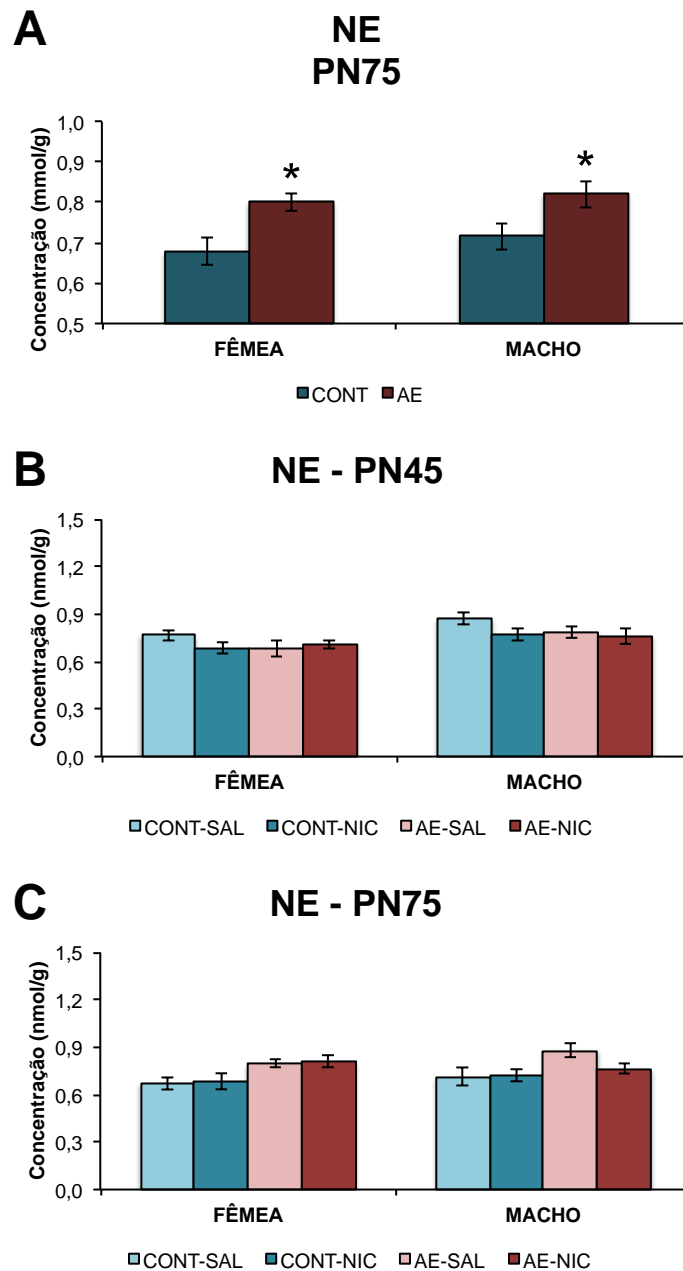
Figura 22 – Razão DOPAC/dopamina no córtex



Legenda: Dados da razão DOPAC/dopamina no córtex cerebral. Em (A) e (B) são apresentados, respectivamente, os dados da razão segmentados por sexo em PN45 e PN75. CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 7-9 animais por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 23 – Concentração de noradrenalina (NE) no córtex



Legenda: Dados da concentração de noradrenalina (NE) no córtex cerebral. Observou-se (A) que tanto em fêmeas quanto em machos em PN45 a concentração de NE é maior nos animais que haviam sido expostos ao ambiente enriquecido, não sendo o resultado afetado pelo tratamento ou não com nicotina. Em (B) e (C) são apresentados, respectivamente, os dados de concentração de NE segmentados por sexo em PN45 e PN75. CONT-SAL: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com salina; CONT-NIC: animais expostos ao ambiente padrão e tratados com nicotina; AE-SAL: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com salina; AE-NIC: animais expostos ao ambiente enriquecido e tratados com nicotina. n = 7-9 animais por grupo e sexo. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2017.

4 DISCUSSÃO

4.1 Vias de administração, doses e idades

Antes de passarmos à discussão dos resultados obtidos, faremos algumas considerações sobre aspectos metodológicos do presente estudo. Tal como indicado anteriormente, a nicotina está presente na folha do tabaco, sendo liberada na fumaça resultante da queima dos diversos produtos (cigarros, charutos, etc.) atualmente disponíveis no mercado que usam esta folha em sua fabricação. A nicotina é considerada fundamental no estabelecimento e manutenção da dependência associada ao tabagismo. Em modelos animais, diversas vias e formas de administração são utilizadas para realizar exposição à nicotina: via oral (através da água de beber ou gavagem), via intraperitoneal (através de injeções únicas ou repetidas), via subcutânea (através de injeções únicas ou repetidas, ou através da implantação de minibombas osmóticas) e via inalatória (através de máquinas de queima automatizada de cigarros), cada uma apresentando vantagens e desvantagens (Matta et al., 2007). No nosso trabalho, a administração subcrônica contínua foi feita através de minibombas osmóticas. Tal via foi escolhida por permitir o controle da dose de exposição à nicotina, mantendo níveis plasmáticos estáveis em animais que apresentam metabolização particularmente rápida da nicotina, e também por envolver níveis menores de estresse quando comparada às injeções repetidas ou a fumaça produzida pela queima dos cigarros (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2003b, 2004; Nunes-Freitas et al., 2011).

A dose utilizada foi de 24 mg/kg/dia, dose esta que produziu nível sérico médio de cotinina, principal metabólito da nicotina, de aproximadamente 69 ng/ml, muito próximo ao reportado por Dickson e colaboradores (2014), que encontraram um nível de cotinina de 62 ng/ml após exposição a 24 mg/kg/dia em camundongos C57BL/6J. Para efeito de comparação, dados prévios do nosso laboratório indicam que a exposição de camundongos Suíços à fumaça gerada a partir de cigarros contendo 1,7 mg nicotina produz nível de 109 ng/ml (Abreu-Villaça et al., 2014). Em humanos adolescentes, Caraballo e colaboradores (2004) relataram níveis de cotinina plasmáticos de 11,4 ng/ml enquanto que Rubinstein e colaboradores (2007), ao avaliarem adolescentes fumantes de escolas públicas na Califórnia (idade média dos usuários: 15 anos, com consumo médio de 3,5 cigarros por dia), encontraram um nível sérico médio de cotinina de 44,1 ng/ml, sendo verificados valores de

1,03 a 162,68 ng/ml, o que indica que, nesta idade, a exposição pode variar muito de indivíduo para indivíduo. Estes dados mostram que nossa dose produziu níveis plasmáticos de cotinina tipicamente encontrados em adolescentes fumantes que fumam menos de 5 cigarros por dia (Rubinstein et al., 2007).

Estudos mostram que adolescentes são mais susceptíveis ao tabaco do que adultos, reportando dependência após o uso de poucos cigarros por dia (Kandel e Chen., 2000) ou até mesmo sem o uso diário (DiFranza et al., 2000). Uma vez estabelecido o uso, indivíduos que iniciaram o hábito durante a adolescência apresentam maior dificuldade em parar de fumar (Klein et al., 2004; Chen e Millar., 1998; Nelson et al., 1995; Pierce e Gilpin., 1996). Dessa forma, observa-se que este é um período crítico para o desenvolvimento da dependência ao tabaco (DiFranza, 2008; Abreu-Villaça et al., 2015; Adriani et al., 2003) e, por isso, avaliamos os efeitos do tratamento com a nicotina durante o período equivalente à adolescência em humanos.

4.2 **Massa corporal**

Nossos resultados não indicam mudanças na massa corporal das progenitoras e dos filhotes, o que mostra que a exposição ao ambiente enriquecido segundo o protocolo utilizado no presente estudo não foi capaz de alterar esse parâmetro durante o período de exposição ao AE. Estudos anteriores que também avaliaram as alterações na massa corporal mostram resultados contraditórios. Alguns autores indicaram, em animais adultos, um maior ganho de massa nos animais que foram expostos ao ambiente enriquecido (Van de Weerd et al., 2002), outros uma diminuição (Monleon et al., 2008) e ainda há trabalhos que reportaram uma ausência de alterações significativas (Benaroya-Milshtein et al., 2004).

Estas discrepâncias podem estar relacionadas às diferenças entre os protocolos utilizados nos estudos citados. Estas diferenças poderiam afetar de forma desigual aspectos diversos do metabolismo do animal, resultando nos diferentes padrões de variação de massa corporal observados: 1) aumento da massa magra (muscular) em resposta ao exercício físico possibilitado por AEs com forte componente exploratório e locomotor (presença de rampas e treliças entre múltiplos andares, rodas de atividade, túneis, etc.); 2) aumento da massa de tecido gorduroso, o que pode ocorrer em AEs que contém objetos nos quais os animais podem abrigar-se, reduzindo o gasto calórico com a manutenção da temperatura corporal. O excesso

de energia resultante da economia feita com a termoregulação seria acumulado, então, como massa gordurosa. Também é possível que um apetite aumentado possa diretamente levar ao aumento de massa; 3) redução da massa de tecido gorduroso associada ao exercício físico resultante da exposição constante ao AE, tendo como efeito o aumento de consumo de energia pelo animal, levando a uma menor deposição de gordura e, eventualmente, até mesmo a uma redução na massa gordurosa suficientemente relevante para compensar quaisquer aumentos advindos dos efeitos na massa muscular.

Os trabalhos que encontraram aumento de peso nos animais que passaram pelo ambiente enriquecido associam essa diferença ao aumento no consumo de ração, que geralmente também é observado nesses animais (Van De Weerd et al., 2002). A maior ingestão de alimentos não é sempre associada como efeito do enriquecimento, mas, como dito anteriormente os métodos e intervalos variam entre diferentes estudos. Sabe-se que, em ambientes enriquecidos, os animais têm mais opções para escolher áreas de diferente qualidade térmica para aninhamento e abrigo. Assim, pode ter havido uma redução na manutenção de calor do corpo e a comida poderia ser utilizada de forma mais eficiente (Van de Weerd et al, 1997). Por outro lado, trabalhos que mostram uma diminuição no peso de animais expostos ao ambiente enriquecido relacionam essa diminuição com possíveis alterações na taxa metabólica, pois animais em ambientes enriquecidos são mais ativos do que animais mantidos no ambiente padrão (Monleon et al., 2008). Pode-se especular ainda que a não observância de alterações somáticas em alguns estudos (Benaroya-Milshtein et al., 2004) resulta de um balanço entre fatores anabólicos e catabólicos associados às diferentes configurações de AE que foram utilizadas.

Além de fatores intrínsecos aos AEs, aspectos ligados à idade em que os animais eram testados, o sexo e outras manipulações experimentais podem ser relevantes para os resultados. Os trabalhos que observaram um aumento no peso dos animais iniciaram a exposição ao ambiente enriquecido aos 21 dias de vida pós-natal, portanto após o período da lactação, enquanto que, em nosso trabalho, o desenvolvimento somático dos animais foi avaliado até a separação materna (PN30), tem que se tivesse iniciado, até este ponto, a exposição à nicotina.

4.3 Testes comportamentais

4.3.1 Campo Aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para avaliar o comportamento de atividade locomotora, que pode ser modulado tanto pela exposição ao ambiente enriquecido como pelo tratamento com a nicotina. Além das interações entre ambiente e nicotina, também avaliamos separadamente os efeitos da exposição ao ambiente enriquecido e do tratamento com a nicotina nas duas idades analisadas (PN45 e PN75). Para os adolescentes, observamos um efeito marcante da exposição ao ambiente enriquecido, aumentando o número de entradas totais e o de entradas na borda, consideradas medidas diretas de atividade locomotora e exploratória, e o número de eventos de autolimpeza. Já para os animais testados na idade adulta (PN75), nós observamos um efeito marcante do tratamento com nicotina aumentando o número de entradas totais, de entradas na borda e de levantamentos, todas consideradas medidas de atividade locomotora e exploratória. Também foi identificado ainda um do tempo que esses animais passaram no centro do aparelho, sugerindo um comportamento de menor ansiedade, uma vez que o centro de equipamentos de teste como o campo aberto são considerados como aversivos aos roedores (Fraga et al., 2011; 2014).

Quando os animais foram testados exatamente após o fim da exposição à nicotina (PN 45, adolescência), nós observamos que, tanto em fêmeas como em machos, a nicotina sozinha não foi capaz de promover alterações significativas na variável principal desse teste que é o número de entradas totais, representando a atividade locomotora total do animal. Porém, nós observamos, nas fêmeas, que o grupo que foi exposto somente ao ambiente enriquecido e tratado com salina (AE-SAL) apresentou um aumento na locomoção quando comparado ao grupo controle e, ainda, que esse aumento não estava presente quando os animais haviam sido previamente expostos ao ambiente enriquecido e posteriormente tratados com nicotina (AE+NIC). Já nos machos da mesma idade, observamos que a exposição ao ambiente enriquecido causou uma diminuição no número de entradas totais, o que significa que, em machos adolescentes, a exposição ao ambiente enriquecido causou uma diminuição na atividade exploratória. Interessante notar que essa diminuição não se manteve quando esses animais eram tratados com nicotina após a exposição ao ambiente enriquecido. Ao testar os animais já na idade adulta (PN75), tivemos um resultado interessante nos machos, onde a

exposição ao AE seguido de tratamento com a NIC resultou em um aumento na ambulação total em comparação ao grupo controle, o que significa um aumento na atividade exploratória desses animais. Como medida secundária, avaliamos também o comportamento associado à ansiedade, que é medido pelo tempo e número de entradas que os animais realizam no centro do aparelho e para essa medida, nós não encontramos diferenças significativas entre nenhum dos grupos analisados.

Além das variáveis principais, avaliamos ainda dois parâmetros etológicos (autolimpeza e elevações), que são consideradas medidas subsidiárias de exploração e atividade (Rodgers et al., 1997). Para autolimpeza, não observamos alterações no número de eventos. Em relação às elevações, tivemos uma diminuição muito significativa nos machos adolescentes que foram expostos somente ao ambiente enriquecido, o que sugere que estes animais apresentaram uma diminuição da atividade exploratória, que pode ser resultado de uma melhor adaptação destes animais, que foram expostos a um ambiente enriquecido, ao serem colocados em um ambiente novo. É interessante notar que quando os animais foram tratados com nicotina, após a exposição ao ambiente enriquecido, esse efeito de diminuição da atividade causado pelo ambiente enriquecido não ocorre.

Estudos prévios já demonstram que a exposição ao ambiente enriquecido aumenta a exploração dos animais quando testados no campo aberto tanto na locomoção total quanto no tempo que eles passam no centro do aparelho (o que não observamos nos nossos animais) (Brenes et al., 2008). Existem algumas divergências em relação a atuação do ambiente enriquecido na exploração. É interessante destacar que geralmente trabalhos que têm como protocolo de teste no campo aberto uma duração total de 5 minutos, têm como resultado um aumento na exploração. Em contrapartida, trabalhos onde o protocolo utilizado foi de 10 minutos observam uma diminuição na exploração (Kazlauckas et al., 2011).

Em relação à nicotina, é conhecido seu efeito de diminuição na exploração total, que geralmente está associado com uma diminuição do comportamento de busca pela novidade (Vaglenova et al., 2004) o que nós não observamos nos nossos resultados nos animais adolescentes, mesmo tendo estes recebido um tratamento com nicotina que resultou em níveis plasmáticos satisfatórios de cotinina (em média: 68 ng/ml). Entretanto nesse estudo a nicotina foi injetada nas mães lactantes, diferentemente do nosso estudo onde o tratamento foi feito cronicamente diretamente na prole. Curiosamente, a longo prazo (PN75), o tratamento com a nicotina desencadeou um aumento na atividade exploratória dos animais adultos. Entretanto, estudos vem demonstrando que adolescentes diferem na resposta à nicotina quando

comparados ao aduto. Adicionalmente, fêmeas adolescentes e adultas são mais sensíveis do que os machos em relação as suas atividades locomotoras (Spear LP.,2000).

4.3.2 Campo Vazado

O teste do campo vazado foi utilizado nesse trabalho para avaliar o comportamento de busca por novidade, que é representado usualmente pelo aumento da exploração de objetos ou estímulos desconhecidos. 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 et al., 2007). Modelos experimentais em animais têm mostrado que a busca por drogas é mais frequente na presença deste comportamento (Piazza et al., 1989; Wills et al., 1994; Bardo et al., 1996; Bardo e Dwoskin., 2004; Abreu-Villaça et al., 2006; Pelloux et al., 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 de um novo ambiente tem sido associada, em ratos, com o aumento dos níveis de dopamina no núcleo accumbens, o qual é frequentemente associado com o fenômeno de recompensa (Hoebel et al., 1983; Robbins e Everitt., 1996; Wise., 1996; Ikemoto e Wise., 2004). Portanto, avaliar o comportamento de busca por novidade se tornou interessante, pois tanto a exposição ao ambiente enriquecido quanto o tratamento com nicotina podem alterar esse comportamento.

Assim como no campo aberto, os animais passaram pelo campo vazado em dois momentos: em PN45 (durante à adolescência) e em PN75 (na idade adulta). Como feito anteriormente para os dados de CA, avaliamos inicialmente os efeitos em separado da exposição ao ambiente enriquecido e do tratamento com a nicotina nas duas idades analisadas. Nos machos adolescentes observamos um efeito da exposição ao ambiente enriquecido aumentando o número de orifícios explorados na borda. Já na idade adulta, detectamos um efeito marcante da nicotina nas fêmeas, aumentando o número de orifícios totais e na borda que foram explorados, representando uma intensificação do comportamento de busca pela novidade em longo prazo.

Como indicado, a variável principal desse teste é o número total de orifícios explorados. Para essa variável, nós observamos que os animais que foram testados logo no fim do

tratamento com a nicotina (PN45) não apresentavam variação em relação ao controle. Para esses animais, a exposição ao ambiente enriquecido e/ou tratamento com a nicotina não foram capazes de alterar o comportamento associado à busca pela novidade. Em contrapartida, quando realizamos esse teste com os animais já na idade adulta nós observamos diferentes efeitos entre os sexos. Nas fêmeas, os animais que foram expostos somente ao tratamento com nicotina apresentaram um aumento no número de orifícios explorados, sendo significativamente diferente tanto do controle como dos outros grupos formados. Estudos envolvendo o tratamento com nicotina geralmente descrevem uma diminuição nesse tipo de comportamento de busca pela novidade (Vaglenova et al., 2004). Tal comportamento geralmente está relacionado com fatores que aumentam a predisposição ao início do uso de drogas. Um dado interessante a ser levado em consideração é que quando os animais foram testados logo após o fim do tratamento com a nicotina, esses não apresentaram aumento na busca pela novidade. Quando os animais foram testados 30 dias após o fim do tratamento, estes já se comportaram de maneira diferente, apresentando um aumento na busca pela novidade. Diante disso, duas hipóteses podem ser levantadas: a primeira é que em PN45 os animais ainda estão sob efeito da droga que naturalmente diminui ou não altera esse comportamento de busca pela novidade e que, em PN75, trinta dias após o fim do tratamento com a nicotina, esses animais podem estar exibindo um comportamento resultante da abstinência da droga, voltando a apresentar comportamentos que são considerados importantes para avaliar a predisposição ao uso de drogas. A segunda hipótese está relacionada ao fato de que o tratamento com nicotina foi realizado durante a adolescência, que é considerada uma janela crítica do desenvolvimento, sendo razoável sugerir que esses animais podem ter sido programados para exibir esse tipo de comportamento na idade adulta.

Nos machos, o primeiro resultado que chama atenção é o fato de que os animais que foram tratados somente com nicotina apresentaram uma redução no número de orifícios explorados, efeito contrário ao encontrado nas fêmeas. Outro fato também importante é que os machos do grupo controle naturalmente já apresentaram um número muito maior de orifícios explorados em relação ao grupo controle das fêmeas, o que não aconteceu para os outros grupos formados. Por isso, é possível que esse comportamento aumentado do grupo controle, tenha alavancado as diferenças significativas entre os grupos. Além disso, tivemos também uma redução ainda maior no grupo que foi exposto somente ao ambiente enriquecido, corroborando dados prévios da literatura (Brenes et al., 2009; Van Praag et al., 2000).

Não foram encontrados efeitos nas medidas relacionadas à atividade no centro do equipamento bem como nos parâmetros etológicos, indicando que os efeitos observados

acima demonstram uma especificidade na ação sobre os comportamentos de busca por novos estímulos.

4.4 **Avaliação neuroquímica**

4.4.1 Dopamina e DOPAC

Sabe-se que os diversos graus de estresse resultam na ativação tanto do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal quanto do simpático-adrenomedular (Marashi et al., 2003). Estímulos estressantes produzem modificações neuroquímicas e de comportamento associados à função do córtex pré-frontal. Os neurônios dopaminérgicos (da área ventral tegmental com projeções para o córtex pré-frontal) são estimulados pelo estresse. O excesso de dopamina pode prejudicar os processos cognitivos associados à memória por meio da ativação excessiva dos receptores D1 (Segovia et al., 2009). Estímulos estressantes constantes levam os animais a apresentarem comportamentos anormais repetitivos sem função óbvia, que podem se elevar a níveis extremos. Alguns pesquisadores acreditam que ratos de ambientes enriquecidos sejam menos estressados, mais dóceis e conseqüentemente mais fáceis de manejar do que animais confinados em ambiente padrão. Muitas pesquisas demonstram que em ambientes enriquecidos há a redução da resposta do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal mediante estímulo estressante. O efeito do estresse é modificado de acordo com níveis de acetilcolina e dopamina que são liberados a partir desse estímulo. Animais de ambientes enriquecidos apresentaram, em alguns estudos, reduzida liberação de acetilcolina mediante estresse, reduzindo a sensibilidade a tal estímulo (Segovia et al., 2009; Van De Weerd et al., 2002). Em razão desses dados, nós utilizamos o HPLC para avaliar os níveis de concentração de dopamina e DOPAC no córtex dos nossos animais.

Assim como na avaliação comportamental, avaliamos de início o efeito da exposição e do tratamento isoladamente sendo que, em relação a dopamina, encontramos um efeito apenas na idade adulta, onde observamos que machos expostos ao ambiente enriquecido apresentaram uma diminuição na concentração de dopamina cortical. Considerando-se as possíveis interações entre exposição e tratamento, observamos que na adolescência e na idade adulta não há alterações na concentração. Porém, ao avaliar esses mesmos parâmetros nos animais adultos, a primeiro fato interessante é que, para a dopamina somente, o nível de concentração desse neurotransmissor já se apresenta muito maior do que aquele encontrado na

adolescência (em todos os grupos). Em relação ao DOPAC, na análise isolada observamos um efeito da nicotina nos machos adultos, diminuindo a concentração deste metabólito no córtex. Não foram encontradas interações significativas entre a exposição e o tratamento.

Del Arco e colaboradores (ANO) mostraram que o ambiente enriquecido não afeta os níveis basais de dopamina. Porém, quando os animais eram avaliados 12 semanas depois, a exposição ao ambiente enriquecido tinha provocado uma redução na densidade dos receptores D1 no córtex pré-frontal. Assim como neste trabalho, a alteração na concentração de dopamina só foi alterada a longo prazo. Como a exposição ao ambiente enriquecido se iniciou em PN15, durante o período da lactação, uma janela importante de *imprinting*, é possível que esses animais tenham sido programados para apresentar essa redução apenas na idade adulta.

Em relação à nicotina sabe-se que os nAChRs, alvos primários da nicotina, são expressos em todo o SNC e podem atuar na modulação da transmissão sináptica de outros neurotransmissores, como a dopamina por exemplo (Dajas-Bailador e Wonnacott, 2004) e que a nicotina pode aumentar a liberação de dopamina, o que não foi observado para os nossos animais. Tivemos um efeito apenas na concentração de DOPAC, onde o grupo formado pelos animais tratados com nicotina apresentaram, na idade adulta, uma diminuição em relação ao grupo dos animais tratados com salina.

4.4.1 Noradrenalina

Finalmente, avaliamos a concentração de noradrenalina no córtex de nossos animais e observamos que, na idade adulta, o grupo formado pelos animais que foram expostos ao ambiente enriquecido apresentou um aumento na concentração de noradrenalina. Esse resultado corrobora trabalhos que mostram um aumento na concentração de noradrenalina no hipocampo (Brenes et al., 2009), estriato (Brenes et al., 2008) e córtex pré-frontal. Tal como para a dopamina e o DOPAC, não observamos interações significativas entre a exposição e o tratamento (Segovia et al., 2008).

4.5 Considerações gerais

Nosso grupo tem experiência no estudo dos efeitos da exposição subcrônica à nicotina durante a adolescência. Nossa ideia foi tentar prevenir os efeitos já conhecidos da nicotina durante este período do desenvolvimento com a exposição prévia ao ambiente enriquecido, o que ainda não tinha sido feito no nosso laboratório utilizando camundongos. De maneira geral, no teste do campo vazado, a nicotina promoveu os efeitos padrões de aumento do comportamento de busca pela novidade, diminuição da ansiedade (em pelo menos 1 das idades) e esses efeitos foram revertidos com a prévia exposição ao ambiente enriquecido. Já no campo aberto, a nicotina não provocou efeitos no grupo tratado. O que ficou mais evidente, nesse teste, foi o efeito da exposição ao ambiente enriquecido.

Com essa tese implementamos o protocolo para exposição ao ambiente enriquecido, com resultados claros, no nosso laboratório e abrimos a possibilidade de ser uma ferramenta de abordagem preventiva e/ou terapêutica nas diversas outras linhas de pesquisa do laboratório, como as que envolvem o uso de álcool, cafeína, entre outras substâncias potencialmente nocivas ao cérebro em desenvolvimento.

Outro ponto interessante desse trabalho é o fato de que a exposição ao ambiente enriquecido foi feita no início da vida e o tratamento com a nicotina foi realizado durante o período da adolescência, que são considerados janelas ou períodos críticos do desenvolvimento, mas que os resultados, de maneira geral, não apareceram quando os animais foram avaliados logo após essa sequência de exposição ao ambiente enriquecido e tratamento com a nicotina em sim na idade adulta. Por isso, é razoável sugerir que a exposição e o tratamento realizados em períodos críticos podem ter desencadeado uma programação metabólica. Atualmente, o termo "plasticidade ontogenética" tem sido mais utilizado e propõe uma forma menos determinística e mais probabilística para explicar o surgimento de resposta a insultos durante as fases particularmente vulneráveis da vida de um indivíduo (Gluckman; Hanson, 2007). Sabe-se que alterações nutricionais, hormonais e ambientais durante estágios críticos do desenvolvimento podem alterar a fisiologia e o metabolismo, provocando o desenvolvimento de distúrbios na vida adulta (De Moura et al., 2005; 2008; Barker et al., 1995; 2003; 2004).

Por fim, a partir de agora, a exposição ao ambiente enriquecido pode ser uma boa possibilidade de estudo nos próximos trabalhos do nosso grupo.

CONCLUSÕES

De maneira geral, a exposição ao ambiente enriquecido e o tratamento com a nicotina geraram alterações comportamentais e nos níveis de neurotransmissores na idade adulta.

No campo vazado, a nicotina promoveu, em machos adultos, um comportamento de mais busca pela novidade e esse comportamento não se manteve quando os animais foram pré-expostos ao ambiente enriquecido. Nesse caso a exposição ao ambiente enriquecido parece atuar como um protetor em relação a esse efeito que está relacionado com comportamentos prévios ao início do uso de drogas.

No campo aberto, a exposição ao ambiente enriquecido aumentou a atividade locomotora em fêmeas adolescentes, o que não se repetiu na idade adulta.

Com relação a dopamina, nossos resultados indicam que, nos machos adultos, a exposição ao ambiente enriquecido diminuiu a contração de dopamina no córtex e que essa diminuição foi ainda maior nos animais expostos ao ambiente e tratados com nicotina. Em relação a noradrenalina observamos resultados diferentes em fêmeas e machos, onde em fêmeas do grupo exposto ao AE e tratado com nicotina apresentou um aumento na concentração, enquanto que nos machos, quem apresentou esse aumento foi o grupo que foi somente exposto ao ambiente enriquecido.

Nossos resultados indicam a clara influência da exposição ao ambiente enriquecido no comportamento dos animais, podendo modular ou até mesmo reverter efeitos causados pelo tratamento com a nicotina de forma gênero-dependente.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Correa-Santos M, Cavina CC, Naiff VF, Krahe TE, Manhães AC, Ribeiro-Carvalho A. Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. *Psychopharmacology*. 2015;232(10):1693-703.
- Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Guthierrez M, Medeiros AH, Mattos MA, Pereira MDOS S, 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 Tob Res*. 2010; 12:776-80.
- Abreu-Villaça Y, Nunes F, Do e Queiroz-Gomes F, Manhães AC, Filgueiras CC. 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.
- Abreu-Villaça Y, Medeiros AH, Lima CS, Faria FP, Filgueiras CC, Manhães AC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal *Behav Brain Res*. 2007; 181:136-46.
- Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes FDO E, Dal Monte AP, Filgueiras CC, Manhães AC. 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; 167:175-82.
- Abreu-Villaça Y, Seidler F, Slotkin TA. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology*. 2004a; 29:1440-50.
- 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(1-2):164-72.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Tate CA, Slotkin TA. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Res*. 2003a;25;979(1-2):114-28.
- Adriani W, Laviola G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behavioural Pharmacology*, 2004; 15: 341-52.
- Adriani W, Laviola G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology*. 2000;39(2):334-46.
- Adriani W, Spijker S, Deroche-Gamonet V, Laviola G, Le Moal M, Smit AB, Piazza PV. Evidence for enhanced neurobehavioral vulnerability to nicotine during periadolescence in rats. *J Neurosci*. 2003;23(11):4712-6.

Adriani W, Laviola G. Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice. *Behav Neurosci.* 2003;117(4):695-703.

Adriani W, Chiarotti F, Laviola G. Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behavioral Neuroscience.* 1998; 112:1152-66.

Almeida, A. M. R; Margarido, T. C. C; Filho, E. L. A. Influência do enriquecimento ambiental no comportamento de primatas do gênero *Ateles* em cativeiro. *Arquivos em Ciências Veterinárias e Zoologia.* 2008;11(2): 97-102.

Andersen SL. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2003;27: 3-18.

Armstrong KR, Clark TR, Peterson MR. Use of Corn-Husk Nesting Material to Reduce Aggression in Caged Mice. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 1998; 37(4):64-66.

Arnett JJ. Adolescent storm and stress, reconsidered. *The American psychologist.* 1999; 54: 317-326.

Baldini S, Restani L, Baroncelli L, Coltelli M, Franco R, Cenni MC, Maffei L, Berardi N. Enriched early life experiences reduce adult anxiety-like behavior in rats: a role for insulin-like growth factor 1. *J Neurosci.* 2013; 33(28):11715-23.

Bardo MT, Dwoskin LP. Biological connection between novelty-and drug-seeking motivational systems. *Nebr Symp Motiv.* 2004; 50:127-58.

Bardo MT, Klebaur JE, Valone JM, Deaton C. Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology.* 2001;155:278-84.

Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res.* 1996; 77(1-2):23-43.

Bardo MT, Bowling SL, Rowlett JK, Manderscheid P, Buxton ST, Dwoskin LP. Environmental enrichment attenuates locomotor sensitization, but not in vitro dopamine release, induced by amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995;51:397-405.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr.* 2004;23(6 Suppl):588S-95S.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol.* 2003;18(8):733-6.

Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest.* 1995;25:457-63.

Beauquis, J., Roig, P., De Nicola, A. F., y Saravia, F. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. 2010; *PloS One*, 5, e13993.

Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci.* 2004;20:1341–7

Benes FM. Myelination of cortical-hippocampal relays during late adolescence. *Schizophrenia Bulletin*, 1989; 15: 585-93.

Bennett EL, Krech D, Rosenzweig MR. Reability and Regional Specificity of Cerebral Effects of Environmental Complexity and Training. *J Comp Physiol Physiol Psychol.* 1964; 57:440-1.

Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P 3RD. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 192:29-60.

Benowitz NL, Zevin S, Jacob P 3rd. Suppression of nicotine intake during ad libitum cigarette smoking by high-dose transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;287(3):958-62.

Bergink V. Glutamate and anxiety. *European neuropsychopharmacology.* 2004; 14: 175-83.

Berthoud HR. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring).* 2006; Suppl 5:197S-200S. Review.

Bezard, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., Jaber, M. Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: Involvement of dopamine transporter and trophic factors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience.* 200;23, 10999-11007.

Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res.* 2009;197(1):125-37.

Brenes JC, Rodriguez O, Fornaguera J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008b;89:85–93.

Brielmaier JM, McDonald CG, Smith RF. Immediate and long-term behavioral effects of a single nicotine injection in adolescent and adult rats. *Neurotoxicology and Teratology.* 2007; 29: 74-80.

Burrows, E. L., McOmish, C. E., y Hannan, A. J. Gene-environment interactions and construct validity in preclinical models of psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 2010;35, 1376-1382.

Bushnell MC, Case LK, Ceko M, Cotton VA, Gracely JL, Low LA, Pitcher MH, Villemure C. Effect of environment on the long-term consequences of chronic pain. *Pain.* 2015;156 Suppl 1:S42-9. Review

- Cameron CM. The environment: whose responsibility. *J S Afr Vet Assoc.* 1993; 64(2):62-6. Afrikaans, English.
- Caraballo RS, Giovino GA, Pechacek TF. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine Tob Res.* 2004;6(1):19-25.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29(8):1193-205.
- Carvalho AFU, Araújo AJ, Farias DF, Rocha-Bezerra LCB, Cavaleiro MG. Development and reproductive performance of Swiss mice in an enriched environment. *Braz J Biol.* 2009;69 (1): 153-60.
- Cassano WJ Jr, D'mello AP. Acute stress-induced facilitation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: evidence for the roles of stressor duration and serotonin. *Neuroendocrinology.* 2001; 74(3):167-77.
- Chambers RA, Taylor JR, Pontezza MN. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *The American Journal Psychiatry.* 2003; 160: 1041-52.
- Chapillon P, Patin V, Roy V, Vincent A, Caston J. Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. *Dev Psychobiol.* 2002; 41(4):373-87.
- Cheeta S, Irvine EE, Tucci S, Sandhu J, File SE. In adolescence, female rats are more sensitive to the anxiolytic effect of nicotine than are male rats. *Neuropsychopharmacology.* 2001; 25: 601-607.
- Chen J, Millar WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Reports.* 1998; 9:39-46.
- Chugani HT: Neuroimaging of developmental nonlinearity and developmental pathologies. In: Thatcher RW, Lyon GR, Rumsey J, Krasnegor N (eds): *Developmental Neuroimaging: mapping the development of brain and behavior.* San Diego, Academic Press. 1996; pp 187-195.
- Conrad CD1, McLaughlin KJ, Harman JS, Foltz C, Wiczorek L, Lightner E, Wright RL. Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J Neurosci.* 2007; 27(31):8278-85.
- Coolon RA, Cain ME. Effects of mecamylamine on nicotine-induced conditioned hyperactivity and sensitization in differentially reared rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;93:59-66.
- Dajas-Bailador F1, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(6):317-24.

Damy, S. B.; Camargo, R. S.; Chammas, R.; Figueredo, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2010; 56(1): 103-11.

Dani JA, Balfour DJ. Historical and current perspective on tobacco use and nicotine addiction. *Trends Neurosci*. 2011.

Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007; 47:699-729.

Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 2001; 70: 439-46.

Dani JA, Radcliffe KA, Pidoplichko VI. Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 393:31-8.

Davis RA, Stiles MF, Debethizi JD, Reynolds JH. Dietary nicotine: a source of urinary cotinine. *Fd Chem Toxic*. 1991; 29:821.

De Carvalho CR, Pandolfo P, Pamplona FA, Takahashi RN. Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res*. 2010; 208(1):231-6.

De Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(3):176-88.

De Moura EG, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, de Picoli Souza K, Passos MC. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem*. 2007;18(2):134-9.

Del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, de Blas M, García-Verdugo JM, Mora F. Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *J Neural Transm (Vienna)*. 2007;114(1):43-8.

Del Arco A, Segovia G, Garrido P, de Blas M, Mora F. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res*. 2007;176(2):267-73.

Dellu-Hagedorn F. Relationship between impulsivity, hyperactivity and working memory: a differential analysis in the rat. *Behav Brain Funct*. 2006; 2:10.

Di Chiara G. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 393:295-314.

Di Franza JR, Rigotti NA, Mcneill AD, Ockene JK, Savageau JA, ST Cyr D, Coleman M. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tobacco control*. 2002; 9: 313-9.

Diamond A. Guidelines for the study of brain-behavior relationships during development. In: Levin HS, Eisenberg HM e Benton AL (Eds) Frontal lobe function and dysfunction, New York: Oxford Univ. Press. 1991; pp. 339-378.

Diamond, M.C. Response of the brain to enrichment. *An acad. Bras. Cienc*,2001;73:211-220.

Dickson PE, Miller MM, Rogers TD, Blaha CD, Mittleman G. Effects of adolescent nicotine exposure and withdrawal on intravenous cocaine self-administration during adulthood in male C57BL/6J mice. *Addict Biol*. 2014;19(1):37-48.

DiFranza, J.R. Hooked from the first cigarette. *Sci. Am*. 2008;298, 82–87.

DiFranza JR, Rigotti NA, McNeill AD, Ockene JK, Savageau JA, St Cyr D, Coleman M. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tob Control*. 2000;9(3):313-9.

Domino EF and Yamamoto KI. Nicotine: effect on the sleep cycle of the cat. *Science*. 1965; 150: 637-8.

Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP. Age-related differences in elevated plus maze behavior between adolescent and adult rats. *Annals of the New York Academy Science*. 2004; 1021: 427-30.

Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavioral*. 2003; 75: 411-418.

Dumas TC, Foster TC. Late developmental changes in the ability of adenosine A1 receptors to regulate synaptic transmission in the hippocampus. *Brain Research Developmental Brain Research*. 1998; 105:137-9.

Dunn AJ, Kramarcy NR. Neurochemical responses in stress: Relationships between the hypothalamic-pituitary-adrenal and catecholamine systems. In: Iversen, LL; Iversen SD e Snyder SH (Eds) *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 18, New York: Plenum. 1984; pp. 455-515.

Diuriex PF, Schiffmann SN, de Kerchove d'Exaerde A. Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum regions. *EMBO J*. 2012; 31:640-53.

Durieux PF, Bearzatto B, Guiducci S, Buch T, Waisman A, Zoli M, Schiffmann SN, de Kerchove d'Exaerde A. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and reward processes. *Nat Neurosci*. 2009;12: 393-95.

Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine and brain development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2008; 84:30-44.

Eckert MJ, Abraham WC. Effects of environmental enrichment exposure on synaptic transmission and plasticity in the hippocampus. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013;15:165-87.

- Elliott BM, Faraday MM, Phillios JM, Grunberg NE. Adolescent and adult female rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 2005; 80:567-75.
- Ericson M, Norrsjo G, Svensson AI. Behavioral sensitization to nicotine in female and male rats. *J Neural Transm*. 2010;117:1033-9.
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P. Inbred Roman high-and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviours. *Physiol. Behav*. 1999; 67(1):19-26.
- Fares RF, Belmeguenai A, Sanchez PE, Kouchi HY, Bodennec J, Morales A et Al. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. *Plos One*. 2013; 8(1): e53888.
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, González B, Tobeña A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Review.Behav Genet*. 1997;27(6):513-26.
- Fraga MC, de Moura EG, da Silva Lima N, Lisboa PC, de Oliveira E, Silva JO, Claudio-Neto S, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y, Manhães AC. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. *Physiol Behav*. 2014;124:100-6.
- Fraga MC, Moura EG, Silva JO, Bonomo IT, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. 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(1):165-73.
- Galani R, Berthel MC, Lazarus C, Majchrzak M, Barbelivien A, Kelche C, Cassel JC. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;88(1):1-10.
- Giedd JN. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Annals of the New York Academy of Science*. 2004; 1021:77-85.
- Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol*. 2007;19(1):1-19.
- Goeders NE. A neuroendocrine role in cocaine reinforcement. *Psychoneuroendocrinology*. 1997; 22: 237-59.
- Gomez MC, Carrasco MC, Redolat R. Differential sensitivity to the effects of nicotine and bupropion in adolescent and adult male OF1 mice during social interaction tests. *Aggress Behav* .2008;34:369-79.
- Grant BF, Harford TC, Grigson MB. Stability of alcohol consumption among youth: A national longitudinal study. *Journal of Studies on Alcohol*. 1987; 49: 253-260.

Green TA, Alibhai IN, Roybal CN, Winstanley CA, Theobald DE, Birnbaum SG, et al. Environmental enrichment produces a behavioral phenotype mediated by low cyclic adenosine monophosphate response element binding (CREB) activity in the nucleus accumbens. *Biol Psychiatry*. 2010;67:28–35.

Green TA, Cain ME, Thompson M, Bardo MT. Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology*. 2003;170:235–41.

Green TA, Gehrke BJ, Bardo MT. Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed-and progressive-ratio schedules. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002;162:373–8.

Grimm, J. W., Osincup, D., Wells, B., Manaois, M., Fyall, A., Buse, C., y Harkness, J. H. Environmental enrichment attenuates cue-induced reinstatement of sucrose seeking in rats. *Behavioural Pharmacology*. 2008;19, 777-785.

Guandolini, G. C. Enriquecimento ambiental para gatos domesticos (*Felis silvestris catus* L.): a importância dos odores. 2009. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. Ribeirão Preto, 2009.

Hamilton DA, Kolb B. Differential effects of nicotine and complex housing on subsequent experience-dependent structural plasticity in the nucleus accumbens. *Behav Neurosci*. 2005;119:355–65.

Hannan AJ. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Review. Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40(1):13-25.

Hannigan, J. H., O’leary-Moore, S. K., y Berman, R. F. Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Reviews. Neuroscience and Biobehavioral*. 2007;31, 202-211.

Hebb DO. The effects of early experience on problem-solving at maturity. *Am Psychol*. 1947; (2):306-307.

Hoebel BG, Monaco AP, Hernandez L, Aulisi EF, Stanley BG, Lenard L. Self-injection of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology (Berl)*. 1983; 81(2):158-63.

Hoffmann LC, Schutte SR, Koch M, Schwabe K. Effect of “enriched environment” during development on adult rat behavior and response to the dopamine receptor agonist apomorphine. *Neuroscience*. 2009;158: 1589–98.

Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 23(5):477-501.

Huang LZ, Abbott LC, Winzer-Serhan UH. Effects of chronic neonatal nicotine exposure on nicotinic acetylcholine receptor binding, cell death and morphology in hippocampus and cerebellum. *Neuroscience*. 2007; 146:1854-68.

Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 2005; 57:79-115

Huttenlocher PR. Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *American Journal of Mental Deficiency.* 1984; 88: 488-96.

Ikemoto S, Wise RA. Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology.* 2004; (47 Suppl 1):190-201.

Ilin Y, Richter-Levin G. Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. *PLoS One.* 2009;4(1):e4329.

Imhof JT, Coelho ZM, Schmitt ML, Morato GS, Carobrez AP. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behavioural Brain Research.* 1993; 56: 177-80.

Isiegas C, Mague SD, Blendy JA. Sex differences in response to nicotine in C57Bl/6:129SvEv mice. *Nicotine Tob Res.* 2009;11:851-8.

Jernigan TL, Trauner DA, Hesselink JR e Tallal PA. Maturation of human cerebrum observed in vivo during adolescence. *Brain.* 1991; 114: 2037-49.

Johansson BB, Ohlsson AL. Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol.* 1996;139:322-7.

Kalsbeek A; Voorn P; Buijs RM; Pool CW , Uylings HB. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* 1988; 269:58-72.

Kandel DB, Chen K. Extent of smoking and nicotine dependence in the United States: 1991-1993. *Nicotine Tob Res.* 2000;2(3):263-74.

Kandel DB, Yamaguchi K. Developmental patterns of the use of legal, illegal, and medically prescribed psychotropic drugs from adolescence to young adulthood. *NIDA Research monograph.* 1985; 56:193-235.

Kazlauckas V, Pagnussat N, Mioranza S, Kalinine E, Nunes F, Pettenuzzo L, Souza DO, PortelaLV, PorciúnculaLO, LaraDR. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiol Behav.* 2011;102(5):475-80.

Kempermann G, Gage FH. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus.* 1999; 9(3):321-32.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci.* 1998; 18(9):3206-12.

- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997b; 94(19):10409-14.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997a; 386(6624):493-5.
- Klein LC, Stine MM, Vandenberg DJ, Whetzel CA, Kamens HM. Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2004; 78: 13-25.
- 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; 6(7):608-18.
- Kohl Z, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kempermann G. Prewaning enrichment has no lasting effects on adult hippocampal neurogenesis in four-month-old mice. *Genes Brain Behav*. 2002; (1):46-54.
- Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in pharmacological Sciences*. 1992; 13: 177-84.
- Kota D, Martin BR, Robinson SE, Damaj MI. Nicotine dependence and reward differ between adolescent and adult male mice. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;322(1):399-407
- Kyerematen GA, Vesell ES. Metabolism of nicotine. *Drug Metab Rev*. 1991; 23:3-41.
- Laviola G, Hannan AJ, Macri S, Solinas M, Jaber M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis*. 2008;31:159-68.
- Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2003; 27: 9-31.
- Lee, V., y Hoaken, P. N. Cognition, emotion, and neurobiological development: Mediating the relation between maltreatment and aggression. *Child Maltreatment*. 2007; 12, 281-298.
- Leger M, Bouet V, Freret T, Darmaillacq AS, Dacher M, Dauphin F, Boulouard M, Schumann-Bard P. Environmental enrichment improves recent but not remote memory in association with a modified brain metabolic activation profile in adult mice. *Behav Brain Res*. 2012a ;1 228(1):22-9.
- Leger M, Quiedeville A, Paizanis E, Natkunarajah S, Freret T, Boulouard M, Schumann-Bard P. Environmental enrichment enhances episodic-like memory in association with a modified neuronal activation profile in adult mice. *PLoS One*. 2012b; 7(10):e48043.
- Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res*. 2005; 163(1):78-90.

Leonard S, Adler LE, Benhammou , Berger R, Breese CR, Drebing C, Gault J, Lee MJ, Logel J, Olincy A, Ross RG, Stevens K, Sullivan B, Vianzon R, Virnich De, Waldo M, Walton K, Freedman R. Smoking and mental illness. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2001; 70:561-70.

Levin ED, Cauley M, Johnson JE, Cooper EM, Stapleton HM, Ferguson PL, Seidler FJ, Slotkin TA. Prenatal dexamethasone augments the neurobehavioral teratology of chlorpyrifos: significance for maternal stress and preterm labor. *Neurotoxicol Teratol*. 2014; 41:35-42.

Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology* .2006;184:523–39.

Levin ED, Simon BB. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*. 1998; 138: 217-30.

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.

Liu N, Wang X, McCoubrey WK, Maines MD. Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon unique to rat testis: control by corticosterone of the oxygenase protein expression. *Gene*. 2000; 241(1):175-83.

Macri's, Adriani W, Chiarotti F, Laviola G. Risk-taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Animal Behavior*. 2002; 64: 541-46.

Makino S, Shibasaki T, Yamauchi N, Nishioka T, Mimoto T, Wakabayashi I, Gold PW, Hashimoto K. Psychological stress increased corticotropin-releasing hormone mRNA and content in the central nucleus of the amygdala but not in the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Brain Res*. 1999; 850(1-2):136-43.

Mansvelder HD, McGehee D. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *Journal of Neurobiology*. 2002; 53: 606-17.

Marashi, V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Hormones and Behavior*.2003; v. 43, p. 281-292.

Martin CA, Kelly TH, Raynes MK, Brogli BR, Brenzel A, Smith WJ, Omar HA. Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence. *Journal of the American Academy Child Adolescent Psychiatry*. 2002; 41:1495-502.

Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, et al. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*.2007a;190:269–319.

Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, Craig CR, Collins AC, Damaj MI, Donny EC, Gardiner PS, Grady SR, Heberlein U, Leonard SS, Levin

ED, Lukas RJ, Markou A, Marks MJ, McCallum SE, Parameswaran N, Perkins KA, Picciotto MR, Quik M, Rose JE, Rothenfluh A, Schafer WR, Stolerman IP, Tyndale RF, Wehner JM, Zirger JM. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007b;190(3):269-319

McNeill AD. The development of dependence on smoking in children. *Br J Addict*. 1991;86(5):589-92.

McBride CM and Pirie PL. Postpartum smoking relapse. *Addict Behav*. 1990;15: 165-68

Meijer MK, Sommer R, Spruijt MB, Van Zutphen LFM, Baumans V. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Lab Anim*. 2007; 41(2): 161-73.

Mesa-Gresa P, Pérez-Martínez A, Redolat R. Nicotine and animal models: what does the environmental enrichment paradigm tell us? *Adicciones* 2012;24:87-94.

Mesa-Gresa P, Moya-Albiol L. Neurobiology of child abuse: the 'cycle of violence'. *Rev Neurol* 2011;52(8):489-503.

Meyer ME. Effects of intraaccumbens dopamine agonist SKF38393 and antagonist SCH23390 on locomotor activities in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;45:843-7.

Mitchell SH. Measures of impulsivity in cigarette smokers and non-smokers. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999; 146: 455-64.

Monleon S, Vinader-Caerols C, Arenas MC, Parra A. Antidepressant drugs and memory: insights from animal studies. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2008;18: 235-48.

Moulard B, Picardi F, Le Hellard S, Agulhon C, Weiland S, Favre I, Bertrand S, Malafosse A, Bertrand D. Ion channel variation causes epilepsies. *Brain Research Brain Research Review*. 2001; 36:275-84.

Nader J, Claudia C, Rawas RE, Favot L, Jaber M, Thiriet N, et al. Loss of environmental enrichment increases vulnerability to cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(7):1579-87.

Nel MR, Morgan M. Smoking and anaesthesia revisited. *Anaesthesia*. 1996; 51:309-11.

Nelson DA, Giovino GA, Shopland DR, Mowery PD, Mills SL, Eriksen MP. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *American Journal of Public Health*. 1995; 85:34-40.

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol*. 1999; 39(4):569-78.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. Mechanisms mediating brain and cognitive reserve: experience-dependent neuroprotection and functional compensation in animal models of neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011; 35(2):331-9.

Nithianantharajah, J., y Hannan, A. J. The neurobiology of brain and cognitive reserve: Mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Progress in Neurobiology*. 2009;89, 369-382.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(9): 697-709.

Nunes-Freitas AL, Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Dutra-Tavares AC, Manhães AC, Lisboa PC, Oliveira E, Gaspar de Moura E, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y. Nicotine exposure during the third trimester equivalent of human gestation: time course of effects on the central cholinergic system of rats. *Toxicol Sci*. 2011;123(1):144-54.

Oliveira-da-Silva A, Vieira FB, Cristina-Rodrigues F, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int J Dev Neurosci*. 2009; 27:539-48.

Pamplona FA, Pandolfo P, Savoldi R, Prediger RD, Takahashi RN. Environmental enrichment improves cognitive deficits in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): relevance for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009; 33(7):1153-60.

Pascual R, Figueroa H. Effects of preweaning sensorimotor stimulation on behavioral and neuronal development in motor and visual cortex of the rat. *Biol Neonate*. 1996; 69(6):399-404.

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; 84(1):43-50.

Piazza PV, Rouge-Pont F, Deminiere JM, Kharoubi M, Lemoal M e Simon H. Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Research*. 1991; 567: 169-74.

Piazza PV, Deminière JM, Le Moal M, Simon H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*. 1989; 245(4925):1511-3.

Pierce JP, Gilpin E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *American Journal of Public Health*. 1996; 86: 253-6.

Pietropaolo, S., Feldon, J., Alleva, E., Cirulli, F., y Yee, B. K. The role of voluntary exercise in enriched rearing: A behavioral analysis. *Behavioral Neuroscience*. 2006; 120, 787-803.

Pitts SM and Horvitz JC. Similar effects of D1/D2 receptor blockade on feeding and locomotor behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;65:433-38.

Poulos CX, Parker JL, Le Da. Increased impulsivity after injected alcohol predicts later alcohol consumption in rats: evidence for "loss-of-control drinking" and marked individual differences. *Behavioral Neuroscience*. 1998; 112: 1247-57.

- Powell K. Neurodevelopment: how does the teenage brain work? *Nature*. 2006; 442: 865-7
- Primus RJ, Kellogg CK. Pubertal-related changes influence the development of environment-related social interaction in the male rat. *Developmental Psychobiology*. 1989; 22: 633-43.
- 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(1-3):3-33.
- Pryce C, Mohammed A, Feldon J. Environmental manipulations in rodents and primates. Insights into pharmacology, biochemistry and behaviour. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 73(1):1-5.
- Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, Feldon J. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005; 29(4-5):649-74.
- Rahman S, Bardo MT. Environmental enrichment increases amphetamine induced glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens: a neurochemical study. *Brain Res*. 2008;1197:40-6.
- Rakic P, Bourgeois JP, Goldman-Rakic PS, Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Progress Brain Research*, 1994; 102: 227-243.
- Rasmuson S, Olsson T, Henriksson BG, Kelly PA, Holmes MC, Seckl JR, Mohammed AH. Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;53(1-2):285-90.
- Redolat R, Mesa-Gresa P. Potential benefits and limitations of enriched environments and cognitive activity on age-related behavioural decline. *Curr Top Behav Neurosci*. 2012;10:293-316.
- Renner MJ, Rosenzweig MR. The golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) as a model for the effects of environmental enrichment in solitary animals. *Dev Psychobiol*. 1987; 20(1):19-24.
- Rested JM, Newhouse PA, Levin ED. Nicotinic treatment for degenerative neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*. 2000; 113:121-9.
- Reynolds S, Lane SJ, Richards L. Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. *J Neurodevelop Disord*. 2010;2: 120-32.
- Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Nunes-Freitas AL, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on depressive-like behavior during exposure and withdrawal. *Behav Brain Res*. 2011; 221:282-9.

Robbins TW, Everitt BJ. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol.* 1996; 6(2):228-36.

Robins LN and Przybeck TR. Age of onset of drug use as a factor in drug and other disorders. *NIDA Research Monograph.* 1985; 56:178-92.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30(3):289-304.

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

Rosenzweig, M.R. Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Anna Rev. Psychol.* 1996;47: 1-32.

Rubinstein ML, Thompson PJ, Benowitz NL, Shiffman S, Moscicki AB. Cotinine levels in relation to smoking behavior and addiction in young adolescent smokers. *Nicotine Tob Res.* 2007;9(1):129-35.

Rueda, A.V., Teixeira, A.M., Yonamine, M., y Camarini, R. Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice. *Addiction Biology.* 2011.

Russell VA. Reprint of "Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder". *J Neurosci Methods.* 2007;166(2):I-XIV.

Salin-Pascual RJ, Moro Lopez ML, Gonzalez-Sanchez H, Blanco-Centurion C. Changes in sleep after acute and repeated administration of nicotine in the rat. *Psychopharmacology.* 1999; 145:133-8.

Santos EC. O método GDS como proposta de ambiente enriquecido: Uma potencial abordagem não farmacológica nas desordens neuroendócrinas e psiquiátricas. *Olhar GDS.* 2015.

Schloesser, R. J., Lehmann, M., Martinowich, K., Manji, H. K., y Herkenham, M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Molecular Psychiatry.* 2010;15, 1152-1163.

Segovia, G., Del Arco, A., De Blas, M., Garrido, P., y Mora, F. Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: A microdialysis study. *Journal of Neural Transmission.* 2010.

Segovia, G.; Arco, A.; Mora, F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *Journal of Neural Transmission.* 2009; v. 116, n. 8, p. 1007-1016.

Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P, Mora F. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behav Brain Res.* 2008;187:304-11.

Simpson JI, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats-- behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res.* 2011;222(1):246-64.

Skwara AJ, Karwoski TE, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME. Influence of environmental enrichment on hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) responses to single-dose nicotine, continuous nicotine by osmotic mini-pumps, and nicotine withdrawal by mecamylamine in male and female rats. *Behav Brain Res.* 2012;234:1–10.

Slawecki CJ. Comparison of anxiety-like behavior in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. *Behavioral Neuroscience.* 2005; 119: 1477-83.

Slawecki CJ, Gilder A, Roth J, Ehlers CL. Increased anxiety-like behavior in adult rats exposed to nicotine as adolescents. *Pharmacology, Biochemistry and Behavioral.* 2003; 75: 355-361.

Smith MA, Iordanou JC, Cohen MB, Cole KT, Gergans SR, Lyle MA, et al. Effects of environmental enrichment on sensitivity to cocaine in female rats: importance of control rates of behavior. *Behav Pharmacol.* 2009;20:312–21.

Smith, M. A., Chisholm, K. A., Bryant, P. A., Greene, J. L., McClean, J. M., Stoops, W. W., y Yancey, D. L. Social and environmental influences on opioid sensitivity in rats: Importance of an opioid's relative efficacy at the mu-receptor. *Psychopharmacology.* 2005.

Smith, M.A., Bryant, P.A., y McClean, J.M. Social and environmental enrichment enhances sensitivity to the effects of kappa opioids: studies on antinociception, diuresis and conditioned place preference. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2003; 200, 93-101.

Solinas M, Thiriet N, Chauvet C, Jaber M. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Prog Neurobiol.* 2010;92:572–92.

Solinas M, Thiriet N, Rawas RE, Lardeux V, Jaber M. Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology.* 2008a;34:1102–11.

Solinas, M., Chauvet, C., Thiriet, N., El Rawas, R., y Jaber, M. Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008b;105, 17145-17150.

Solinas, M., Thiriet, N., El Rawas, R., Lardeux, V., y Jaber, M. Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology.* 2009;34, 1102-1111.

Sowell ER; Thompson PM; Tessner KD e Toga AW. Mapping continued brain growth and gray matter density reduction in dorsal frontal cortex: Inverse relationships during postadolescent brain maturation. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the society for neuroscience.* 2001; 21:8819-29.

Spear LP. The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *Journal of Study Alcohol Supplement*. 2002; 14: 71-81.

Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2000; 24: 417-63.

Stamford JA. Development and ageing of the rat nigrostriatal dopamine system studied with fast cyclic voltammetry. *Journal of Neurochemistry*. 1989; 52:1582-9.

Stewart K, Bayne K. Environmental enrichment for laboratory animals. In: Reuter JD, editor. *Laboratory animal medicine and management*. New York: International veterinary information service.2004.

Stolerman IP, Shoaib M. The neurobiology of tobacco addiction. *Trends in pharmacological science*. 1991; 12:467-73

Sztainberg Y, Kuperman Y, Tsoory M, Lebow M, Chen A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Mol Psychiatry*. 2010; 15(9):905-17.

Tanda G, Goldberg SR. Alteration of the behavioral effects of nicotine by chronic caffeine exposure. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;66(1):47-64.

Taylor P. Agentes que Atuam na Junção Neuromuscular e nos Gânglios Autônomos. *Goodman & Gilman*. 1996; 9:131-45.

Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC JR. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Brain Research Developmental Brain Research*. 1995; 89:167-72.

Thiel CM, Müller CP, Huston JP, Schwarting RK. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*. 1999; 93(1):243-51.

Thiel KJ, Engelhardt B, Hood LE, Peartree NA, Neisewander JL. The interactive effects of environmental enrichment and extinction interventions in attenuating cue-elicited cocaine-seeking behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav*.2011a;97:595–602.

Thiel KJ, Pentkowski NS, Peartree NA, Painter MR, Neisewander JL. Environmental living conditions introduced during forced abstinence alter cocaine-seeking behavior and Fos protein expression. *Neuroscience*.2010b;171:1187–96.

Thiriet, N., Gennequin, B., Lardeux, V., Chauvet, C., Decressac, M., Janet, T., Solinas, M. Environmental enrichment does not reduce the rewarding and neurotoxic effects of methamphetamine. *Neurotoxicity Research*.2011;19, 172-182.

Trauth JA, Seidler FJ, Mccook EC, Slotkin TA. Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions. *Brain research*. 1999; 851: 9-19.

Tribollet E, Bertrand D, Marguerat A, Raggenbass M. Comparative distribution of nicotinic receptor subtypes during development, adulthood and aging: an autoradiographic study in the rat brain. *Neuroscience*. 2004; 124:405-20.

Urakawa S, Takamoto K, Hori E, Sakai N, Ono T, Nishijo H. Rearing in enriched environment increases parvalbumin-positive small neurons in the amygdala and decreases anxiety-like behavior of male rats. *BMC Neurosci*. 2013; 14:13.

Urakawa N, Nagata T, Kudo K, Kimura K, Imamura T.. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in various human tissues using capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Int J Legal Med*. 1994; 106:232-36.

Vaglenova J, Birru S, Pandiella NM, Breese CR.. An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. *Behav Brain Res*. 2004; 150:159-70.

Van eden CG, Kros JM, Uylings HBM. The development of the rat prefrontal cortex: Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. *Progress in Brain Research: Vol.85. The Prefrontal cortex: Its Structure, Function and Pathology*, New York: Elsevier Science. 1990; pp. 169-83.

Van de Weerd HA, Aarsen EL, Mulder A, Kruitwagen CL, Hendriksen CF, Baumans V. Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. *J Appl Anim Welf Sci*. 2002;5:87–109.

Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice. *Physiol Behav*. 1997;62(5):1019-28.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000; 1(3):191-8.

Volkow ND, Li TK. Drugs and alcohol: treating and preventive abuse, addiction and their medical consequences. *Pharmacology and therapeutics*. 2005; 108: 3-17.

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.

Wilmouth CE, Spear LP. Withdrawal from chronic nicotine in adolescent and adult rats. *Pharmacology, biochemistry and behavior*. 2006; 85: 648-57.

Wise RA. Cocaine reward and cocaine craving: the role of dopamine in perspective. *NIDA Res Monogr*. 1994; 145:191-206.

Wong YN, Cassano WJ Jr, D'mello AP. Acute-stress-induced facilitation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroendocrinology*. 2000; 71(6):354-65.

Wong, C.C., Mill, J., y Fernandes, C. Drugs and addiction: an introduction to epigenetics. *Addiction*. 2011;106, 480-489.

Würbel H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci*. 2001; 24: 207–211.

Xavier GF. Dentate gyrus-selective alchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus*. 1999;9:668-81.

Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, OU CN, Patrick J, Role L, DE Biasi M, Beaudet AL. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the national academy of science of the USA*. 1999; 96: 5746-51.

Zecevic N, Bourgeois JP, Rakic P. Changes in synaptic density in motor cortex of rhesus monkey during fetal and postnatal life. *Brain Research Developmental Brain Research*. 1989; 50:11-32.

Zhu J, Bardo MT, Green TA, Wedlund PJ, Dwoskin LP. Nicotine increases dopamine clearance in medial prefrontal cortex in rats raised in an enriched environment. *J Neurochem*. 2007;103:2575–88.

Zhu J, Apparsundaram S, Bardo MT, Dwoskin LP. Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *J Neurochem*. 2005;93(6):1434-43.

Zhu J, Green T, Bardo MT, Dwoskin LP. Environmental enrichment enhances sensitization to GBR 12935-induced activity and decreases dopamine transporter function in the medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res*. 2004;148:107–17.

Zuckerman M. Smoking, drinking, drugs and eating. In: *Behavioral Expressions and Biosocial Basis of Sensation Seeking*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. 1994; 225-257.