



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

Bruna Messias Lotufo

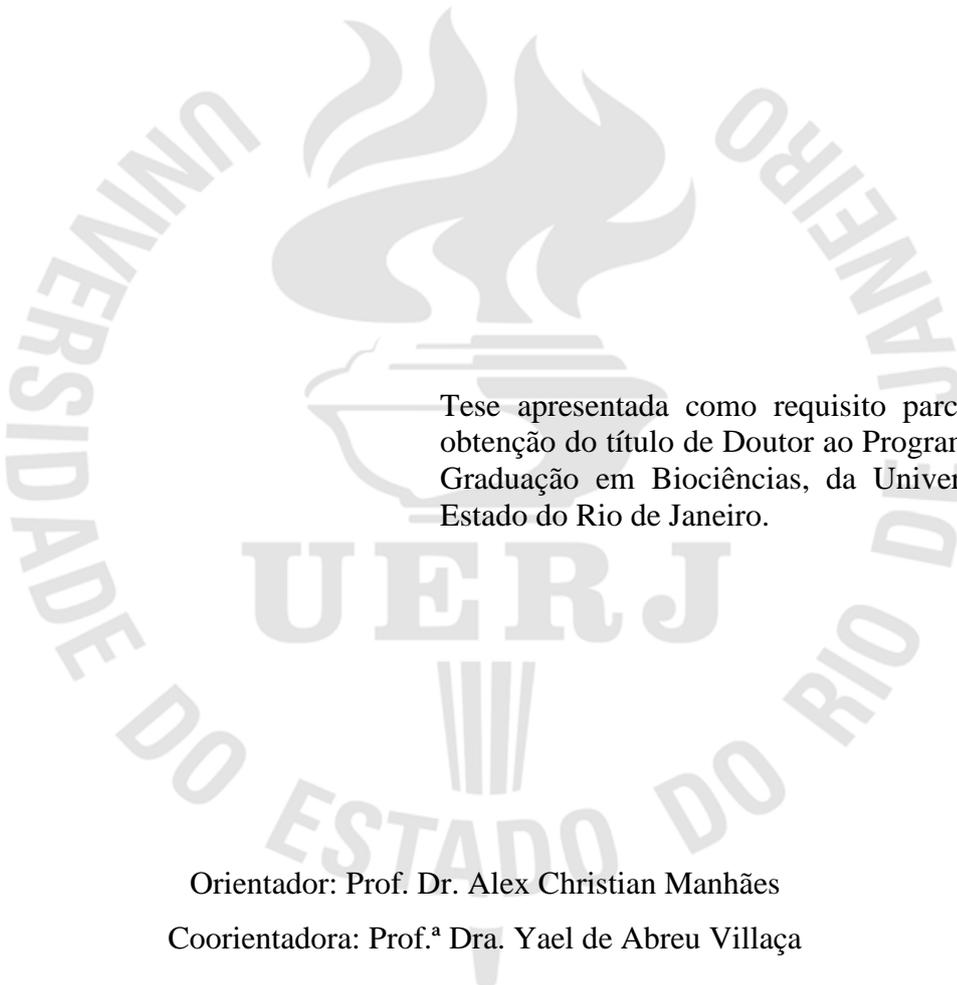
**Análise comparativa entre os efeitos da exposição à nicotina e retirada na
adolescência ou na vida adulta sobre os comportamentos associados à
ansiedade, a atividade locomotora e a função adrenal de camundongos
machos e fêmeas**

Rio de Janeiro

2016

Bruna Messias Lotufo

Análise comparativa entre os efeitos da exposição à nicotina e retirada na adolescência ou na vida adulta sobre os comportamentos associados à ansiedade, a atividade locomotora e a função adrenal de camundongos machos e fêmeas



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. Yael de Abreu Villaça

Rio de Janeiro

2016

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

L884 Lotufo, / Bruna Messias.

Análise comparativa entre os efeitos da exposição à nicotina na adolescência ou na vida adulta sobre os comportamentos associados à ansiedade, a atividade locomotora e a função adrenal / Bruna Messias Lotufo. – 2016.

102 f.

Orientador: Alex Christian Manhães

Coorientadora: Yael Abreu Villaça

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

1. Nicotina - Teses. 2. Transtorno por Uso de Tabaco - Fisiopatologia. 3. Ansiedade- Teses. 4. Comportamento do adolescente - Efeito de drogas. 5. Sistema Endócrino - Fisiologia. I. Manhães, Alex Christian. II. Abreu-Villaça, Yael de III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 613.84

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

Assinatura

Data

Bruna Messias Lotufo

Análise comparativa entre os efeitos da exposição à nicotina e retirada na adolescência ou na vida adulta sobre os comportamentos associados à ansiedade, a atividade locomotora e a função adrenal de camundongos machos e fêmeas.

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.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2016.

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

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alex Christian Manhães (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Isis Hara Trevenzoli
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Tania Marcourakis
Universidade de São Paulo

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

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

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTO

À minha família, meus pais, minhas irmãs Bianca e Barbara, minha vózinha Augusta, e meus queridos cunhados, Ricardo e Leandro, por terem apoiado e acompanhado todas as minhas decisões. Por todo amor, pela paciência, pelo incentivo e por acreditarem em mim. Vocês são fundamentais na minha vida.

Ao meu orientador Alex por ter me aceitado como aluna, por toda confiança e incentivo, pela contribuição para a minha formação profissional. A você eu devo grande parte do meu amadurecimento profissional.

Aos meus companheiros de bancada, Sylvão, Natalie, Jemima, e aos ICs Gabriel e Vitor. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tornarem meus finais de semana no Lab mais divertidos, pela amizade e dedicação que sempre tiveram com meu trabalho.

Aos Professores Yael e Cláudio, pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À Patrícia Lisboa, pela colaboração e ajuda. Você foi fundamental.

À querida Cíntia Pinheiro, pela ajuda mais que indispensável para a realização de toda análise endócrina. Por sua causa eu acho as bandas de blot lindas (rs).

Aos queridos amigos, Fernandinha, Anna do Flúor, Gabriela, Paulinho, LO e Viviane por sempre estarem presentes, pela amizade além do laboratório.

A todos os companheiros do Lab, por tornarem o ambiente mais divertido.

Eu faço parte dos que acham que a ci4ncia 4 bel4ssima.

Marie Curie

RESUMO

LOTUFO, Bruna Messias. *Análise comparativa entre os efeitos da exposição à nicotina e retirada na adolescência ou na vida adulta sobre os comportamentos associados à ansiedade, a atividade locomotora e a função adrena de camundongos machos e fêmeas.*. 2016. 102 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O tabagismo é a principal causa de morte evitável em todo o mundo e é um dos principais fatores de risco para uma série de doenças. A Organização Mundial da Saúde estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas sejam fumantes. A adolescência é considerado um período crítico de vulnerabilidade para iniciar o hábito de fumar e a maioria dos fumantes iniciam o hábito durante a adolescência. Neste estudo, os objetivos foram avaliar os comportamentos associados à ansiedade e atividade locomotora e a função da glândula adrenal em animais expostos à nicotina durante a adolescência ou vida adulta e subsequentes períodos de abstinência da nicotina. Este estudo utilizou 462 camundongos Suíços adolescentes e adultos (de ambos os sexos). Os animais foram expostos à solução aquosa de nicotina (50µg/ml – NIC e 2% - SAC) ou de sacarina (2% - SAC) do 30º dia de vida pós-natal (PN) à PN45, durante a adolescência, ou de PN75 a PN91 para a idade adulta. Os animais foram testados no labirinto em cruz elevado (LCE) nas seguintes idades: durante a exposição (PN45; PN90), cinco dias de retirada da droga (PN50; PN95) ou 10 dias (PN55; PN100). Para o Campo aberto (CA): durante a exposição (PN46; PN91), cinco dias de retirada (PN51; PN96) ou 10 dias (PN56; PN101). Os animais foram submetidos ao LCE por 5 min, e no dia seguinte foram submetidos ao CA também por 5 min. Os animais foram sacrificados 2 horas após o término do CA e as adrenais coletadas para a verificação do conteúdo de catecolaminas, expressão da tirosina hidroxilase e sangue para a dosagem de cotinina e corticosterona. Para avaliar somente os efeitos da exposição à nicotina, adicionalmente foi acrescentado um grupo de animais não submetidos aos testes comportamentais. Os nossos resultados demonstraram que durante a exposição à nicotina ou durante os períodos de retirada da droga não foram encontradas diferenças entre os grupos em ambas as idades estudadas nos comportamentos associados à ansiedade no LCE. No CA, o grupo nicotina, durante 10 dias de retirada, apresentou aumento do tempo no centro durante a adolescência. Enquanto para os adultos, as fêmeas nicotina apresentaram aumento do tempo no centro. Para o tempo na esquina, a exposição à nicotina gerou aumento do tempo na esquina para os animais durante a adolescência. Em relação ao número de entradas no centro, durante a vida adulta, o grupo nicotina apresentou menor número de entradas durante 10 dias de retirada. As fêmeas nicotina tiveram o número de entradas na esquina aumentados. O grupo nicotina apresentou aumento das entradas totais durante a adolescência. Do ponto de vista endócrino, o conteúdo adrenal de catecolamina foi aumentado pela exposição a nicotina nos animais machos durante a vida adulta, os níveis séricos de corticosterona foram afetados pela nicotina enquanto a expressão de tirosina hidroxilase foi reduzida no grupo nicotina machos durante a vida adulta. Nosso estudo indica que exposição à nicotina foi capaz de afetar tanto os aspectos comportamentais como endócrinos durante a exposição e em diferentes períodos de retirada da droga.

Palavras-chave: Nicotina. Adolescência. Adulto. Comportamento. Glândula Adrenal.

ABSTRACT

LOTUFO, Bruna Messias. *Comparative analysis of the effects nicotine exposure and withdrawal in adolescence ou adulthood onthe behaviors associated with anziety, locomotor activity and adrenal gland function in male and felame mice*. 2016. 102 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The tobacco epidemic is the single most preventable cause of death in the world and tobacco use is a risk factor for a number of diseases. WHO estimates that one-third of the adult population, 1 billion and 200 million, people are smokers. Adolescence is a critical period of vulnerability to smoking initiation and most adult smokers began smoking during adolescence. The aim of the present work is to study the behaviors associated with anxiety and locomotion activity, as well as adrenal function, in animals exposed to nicotine during adolescence or adult age and subsequently periods of withdrawal. This study used 462 adolescents and adults Swiss mice of both sexes. The animals were exposed (orally) to a nicotine (50µg/ml – NIC e 2% - SAC) solution or a saccharine (2% - SAC) solution from the 30th postnatal day (PN) to PN45 during adolescence, or PN75 to PN91 for adult age. The animals were tested in the elevated plus maze (EPM) during exposure (PN45; PN90), 5 days withdrawal (PN50; PN95) and 10 days withdrawal (PN55; PN100). For Open Filed (OF) animals were tested during exposure (PN46; PN91), 5 days withdrawal (PN51; PN96) and 10 days withdrawal (PN56; PN101). The animals were tested in the EPM for 5 min and, in the next day, they were tested for 5 min on the OF. The tissue samples were collected 2h later the OF test (after the animals sacrifice). The tissue samples collected were: left adrenal gland for the analysis of catecholamine content; right adrenal gland for the analysis of tyrosine hidroxilase expression; serum for the analysis of cotinine and corticosterone concentration. To analyze only the nicotine effects a group of animals were not subjected to behavioral tests. Our results show that by during exposure or withdrawal period no differences were observed between groups regarding behaviors associated with anxiety in the EPM. In the OF, the NIC group during 10 days withdrawal presented a higher time in center during adolescence. For adults, females NIC showed a higher time in center. Regarding time in the corner, NIC group presented a higher time than SAC group at adolescence. For adults, at 10 days withdrawal period, NIC group showed fewer entries in center. Besides, female NIC group presented a higher number of entries in the corner. At adolescence, NIC group showed higher locomotion activity. Regarding the endocrine system, the catecholamine content was higher in NIC male group in adults. The corticosterone levels were affect by nicotine exposure besides the tyrosine hidroxilase expression was reduced in male NIC group at adulthood. Our study indicates that, behavioral as well as endocrine parameters were affected in our model of nicotine exposure during adolescence or adult and different withdrawal periods.

Keywords: Nicotine. Adolescence. Adult. Behavioral. Adrenal gland.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental.....	33
Figura 2 - Labirinto em cruz elevado.....	35
Figura 3 - Campo aberto.....	37
Figura 4 - Consumo de líquidos em adolescentes e adultos, segmentados por exposição ou sexo.....	45
Figura 5 - Média massa corporal em adolescentes e adultos, segmentados por sexo.....	46
Figura 6 - Labirinto em Cruz Elevado: tempo no braço aberto.....	47
Figura 7 - Labirinto em Cruz Elevado: entradas e percentual de entradas no braço aberto...	49
Figura 8 - Labirinto em Cruz Elevado: percentual de tempo no centro.....	49
Figura 9 - Labirinto em Cruz Elevado: percentual de tempo no braço aberto e entradas no fechado.....	50
Figura 10 - Labirinto em Cruz Elevado: elevações.....	51
Figura 11 - Labirinto em Cruz Elevado: alongamentos.....	52
Figura 12 - Labirinto em Cruz Elevado: explorações com a cabeça.....	53
Figura 13 - Campo Aberto: ambulação total e percentual de ambulação no centro.....	56
Figura 14 - Campo Aberto: tempo no centro.....	57
Figura 15 - Campo Aberto: ambulação no centro.....	58
Figura 16 - Campo Aberto: tempo e ambulação na esquina.....	59
Figura 17 - Campo Aberto: tempo e ambulação na borda.....	60
Figura 18 - Campo Aberto: elevações.....	61
Figura 19 - Campo Aberto: autolimpeza.....	61
Figura 20 - Campo Aberto: alongamentos.....	62
Figura 21 - Catecolaminas segmentadas por sexo.....	64
Figura 22 - Catecolaminas segmentadas por exposição.....	65
Figura 23 - Catecolaminas segmentadas por período.....	65
Figura 24 - Tirosina Hidroxilase segmentada por idade e sexo.....	66
Figura 25 - Tirosina Hidroxilase segmentada por idade, exposição e sexo.....	67
Figura 26 - Corticosterona segmentada por exposição.....	70
Figura 27 - Corticosterona segmentada por período.....	71
Figura 28 - Corticosterona segmentada por sexo.....	72
Figura 29 - Corticosterona segmentada por período.....	73
Figura 30 - Corticosterona segmentada por período.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos avaliados no projeto.....	32
Quadro 2 - Anticorpos utilizados.....	40
Quadro 3 - Resultados segmentados por idade.....	75
Quadro 4 - Resultados segmentados por idade e sexo.....	76
Quadro 5 - Resultados segmentados por idade e período.....	77
Quadro 6 - Resultados segmentados por idade, período e sexo.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de animais utilizados no projeto.....	30
Tabela 2 - Resultado dos comportamentos etológicos no Labirinto em Cruz Elevado.....	54
Tabela 3 - Resultado dos comportamentos etológicos no Campo Aberto.....	62
Tabela 4 - Resultados de catecolaminas e corticosterona.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AD	Adrenalina
ANOVA	Análise de Variância
ANOVA _m	Análise de Variância multivariada
ANOVA _r	Análise de Variância com medidas repetidas
CA	Campo aberto
CPF	Córtex pré-frontal
CPP	Conditioned Place Preference
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CYP2A6	Citocromo P450 2A6
CYP2B6	Citocromo P450 2B6
CYP2D6	Citocromo P450 2D6
DOPA	Dopamina
DOPA-d	Dopa-descarboxilase
DβH	Dopamina β-hidroxilase
EPM	Erro padrão da média
F	Razão de Fischer
FNMT	Feniletanolamina N-metiltransferase
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional de Câncer
K ⁺	Potássio
K-S	Kolmogorov - Smirnov
LCE	Labirinto em cruz elevado
L-DOPA	3,4-dihidroxif-L-fenilalanina
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Sódio
NAc	Núcleo accumbens
nAChR	Receptores nicotínico colinérgicos
NaOH	Hidróxido de sódio
NIC	Grupo de animais expostos à nicotina

OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Valor de prova
PN	Dia de vida pós-natal
PS	Próximo da significância
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
SAC	Grupo de animais expostos à sacarina
SNC	Sistema nervoso central
TH	Tirosina hidroxilase
VTA	Área tegmental ventral

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1	Nicotina.....	17
1.1.1	<u>Mecanismo de ação da nicotina.....</u>	17
1.1.2	<u>Dessensibilização e suprarregulação dos receptores nicotínicos.....</u>	19
1.1.3	<u>Efeitos da retirada da nicotina.....</u>	20
1.2	Desenvolvimento do sistema nervoso central.....	21
1.3	Adolescência.....	22
1.4	Nicotina e comportamento.....	23
1.4.1	<u>Ansiedade.....</u>	24
1.4.2	<u>Atividade Locomotora.....</u>	25
1.5	Nicotina e função adrenal.....	25
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Animais.....	29
3.2	Grupos Experimentais.....	31
3.3	Consumo líquido e massa corporal.....	34
3.4	Testes comportamentais.....	34
3.4.1	<u>Labirinto em cruz elevado.....</u>	35
3.4.2	<u>Campo Aberto.....</u>	37
3.5	Coleta dos tecidos.....	38
3.6	Dosagem de Cotinina.....	39
3.7	Determinação do conteúdo adrenal de catecolaminas totais.....	39
3.8	Análise da expressão de proteínas por Western blotting.....	40
3.9	Radioimunoensaio.....	41
3.10	Análise estatística.....	41
3.10.1	<u>Consumo líquido e massa corporal.....</u>	41
3.10.2	<u>Parâmetros comportamentais.....</u>	42
3.10.3	<u>Parâmetros endócrinos.....</u>	42
4	RESULTADOS.....	44

4.1	Cotina	44
4.2	Consumo de líquidos	44
4.3	Massa corporal	46
4.4	Análise comportamental	47
4.4.1	<u>Labirinto em Cruz Elevado</u>	47
4.4.2	<u>Campo Aberto</u>	54
4.5	Análise endócrina	63
4.5.1	<u>Conteúdo de catecolaminas</u>	63
4.5.2	<u>Expressão de Tirosina Hidroxilase</u>	66
4.5.3	<u>Corticosterona</u>	68
5	DISCUSSÃO	75
5.1	Resumo dos resultados	75
5.2	Níveis séricos de cotinina, consumo de líquidos e massa corporal	78
5.3	Análise comportamental	79
5.3.1	<u>Labirinto em Cruz Elevado</u>	79
5.3.2	<u>Campo Aberto</u>	80
5.4	Catecolamina, TH e Corticosterona	82
	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87

INTRODUÇÃO

Tabagismo no mundo e no Brasil

O tabagismo é a principal causa de morte evitável em todo o mundo. O uso do tabaco é um dos principais fatores de risco para uma série de doenças, incluindo câncer, doenças pulmonares e doenças cardiovasculares. No século XX, cem milhões de mortes foram causadas pelo tabaco. Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (2015) (*World Health Organization – WHO*), o fumo mata cerca de 6 milhões de pessoas por ano. Mais de 5 milhões dessas mortes são o resultado do uso direto do tabaco, enquanto mais de 600 mil resultam da exposição passiva ao fumo. Além disso, o número anual de mortos pode subir para 8 milhões até 2030, e 80% desses óbitos acontecerão nos países em desenvolvimento. O tabaco irá matar até 1 bilhão de pessoas ainda neste século. No Brasil, estima-se que, a cada ano, 200 mil brasileiros morram precocemente devido às doenças causadas pelo tabagismo (Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2015).

A OMS (2015) estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas sejam fumantes. Aproximadamente 47% de toda a população masculina e 12% da população feminina no mundo fumam. Enquanto nos países em desenvolvimento os fumantes constituem 48% da população masculina e 7% da população feminina, nos países desenvolvidos o número de mulheres fumantes mais do que triplica: 42% dos homens e 24% das mulheres apresentam o hábito de fumar.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2009) (IBGE) no Brasil, cerca de 24,6 milhões de brasileiros de 15 anos ou mais de idade fumavam derivados de tabaco em 2008. Os percentuais de fumantes eram maiores entre os homens, entre 45 e 64 anos de idade. Além disso, a maior parte dos fumantes começou a fumar com 17 a 19 anos de idade, e entre os fumantes diários, o mais comum era consumir cerca de 15 a 24 cigarros por dia. A adolescência é considerada um período crítico de vulnerabilidade para iniciar o hábito de fumar (Kandel e Logan, 1984). Aproximadamente 90% dos fumantes iniciam o hábito de fumar durante a adolescência (Chen et al., 1998; Pierce et al., 1996) e a grande maioria serão fumantes diários quando atingirem a idade adulta (Nelson et al., 1995). Além disso, indivíduos que começaram a fumar na adolescência apresentam maior dificuldade para cessar o hábito do que aqueles que iniciam em idades posteriores (Chen e Millar, 1998). Indivíduos

que não iniciam o hábito durante a adolescência raramente iniciarão tardiamente (Chen e Kandel 1995; Kandel e Logan, 1984).

Atualmente o percentual de brasileiros que fumam caiu 30,7% nos últimos nove anos. Segundo dados do Vigitel 2014, 10,8% dos brasileiros fumam. Apesar da redução do número de fumantes, um estudo realizado pelo INCA, demonstrou aumento do consumo de cigarros industrializados de origem ilícita. Em 2008, 2,4% dos brasileiros com idade maior ou igual a 18 anos fumavam cigarros industrializados obtidos por meio do mercado ilegal; em 2013, foram 3,7%. O aumento do preço dos cigarros está entre os principais motivos para a redução do consumo de tabaco no Brasil. Segundo a Pesquisa ICT/INCA 2013, 62% dos fumantes pensaram em parar de fumar devido ao custo do cigarro. Importantes ações para o controle do tabagismo foram promovidas como a aprovação da Lei dos Ambientes Livres; a regulamentação da Lei antifumo proibiu o consumo de cigarros, assim como cigarrilhas, cachimbos e outros produtos, derivados ou não do tabaco, em locais de uso coletivo, público ou privados. Ainda dentro das ações que vem sendo desenvolvidas está a política de preço mínimo para o cigarro e aumento dos impostos, e a proibição da propaganda comercial de cigarros em todo território nacional, sendo permitida a exposição dos produtos nos locais de vendas. Além da obrigatoriedade da indústria colocar advertências sobre os malefícios do cigarro nas embalagens.

A despeito das campanhas realizadas em diversos países do mundo, incluindo o Brasil, e da redução do consumo de produtos derivados de tabaco em diversos destes países, a dependência química à nicotina é, e continuará sendo por décadas, um grave problema de saúde. De particular interesse para o presente estudo é o fato de que o consumo de tabaco, principalmente na forma de cigarro, tem início na adolescência. Como já indicado anteriormente, a adolescência é considerada um período vulnerável do ponto de vista dos efeitos de diferentes tipos de substâncias psicoativas sobre o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central. Infelizmente, a despeito dos dados epidemiológicos concernentes ao consumo de tabaco na adolescência e das evidências de maior vulnerabilidade deste período da vida aos efeitos de drogas neste sistema, são comparativamente poucos os estudos disponíveis sobre a ação da nicotina no cérebro durante a adolescência. Assim, o presente estudo utilizou um modelo experimental de exposição à nicotina em roedores com o qual o Laboratório de Neurofisiologia da UERJ tem grande experiência para verificar se existem diferenças do ponto de vista dos comportamentos associados à ansiedade e da atividade locomotora entre a exposição à esta droga durante a adolescência ou na vida adulta, no período da vigência e retirada. Adicionalmente, como a ansiedade está associada à função do

eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, parâmetros funcionais deste sistema endócrino foram avaliados no presente estudo nas duas idades.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Nicotina

O cigarro é composto por várias substâncias químicas como, a nicotina, o tiocianato, o monóxido de carbono e outros gases tóxicos (Stellman e Djordjiciv, 2009). A nicotina, principal componente aditivo que causa dependência do cigarro, é uma substância alcalóide presente nas folhas de tabaco. A nicotina é absorvida pelo trato respiratório, mucosas orais e pele. A metabolização ocorre principalmente no fígado (cerca de 80 a 90%) e em menor proporção em outros órgãos como pulmão e rins (Hukkanen e Jacob, 2005). Em seres humanos, sua meia-vida é de aproximadamente 2 horas (Rang et al, 2004; Jacob et al, 1988). Foram identificados 6 metabólitos da nicotina, sendo o principal um produto da oxidação da nicotina em um metabólito cetônico inativo, a cotinina (Rang et al, 2004). A metabolização da nicotina em cotinina ocorre inicialmente pelo complexo citocromo P450 onde a isoenzima CYP2A6 e outras como a CYP2B6 e a CYP2D6 transformam inicialmente no íon nicotina- $\Delta 1'$ (5')-iminium, o qual sofre uma oxidação citoplasmática gerando a cotinina (Meyer e Maurer, 2011; Benowitz, 2009; Hukkanen e Jacob, 2005). Por possuir meia-vida de eliminação longa, cerca de 20 horas em seres humanos (Taylor 1996) e de 5,2 horas em roedores (Kyerematen e Vesell, 1991), os níveis de cotinina em diferentes fluidos corporais são excelentes parâmetros para avaliar a intensidade da exposição ao tabaco, sendo considerados inclusive mais eficientes do que a própria nicotina, que possui meia-vida relativamente curta (Eskenazi et al, 1995). Desta maneira, a concentração de cotinina pode ser medida no sangue, urina, saliva (Nel e Morgan, 1996).

1.1.1 Mecanismo de ação da nicotina

A nicotina se liga a receptores nicotínicos colinérgicos (nAChR) nos gânglios autônomos, na medula adrenal, na junção neuromuscular e no sistema nervoso central (SNC), exercendo um efeito dose-dependente. No SNC, a nicotina ativa os nAChRs, os quais estão amplamente distribuídos pelo tecido, localizando-se, do ponto de vista celular, principalmente

na membrana pré-sináptica e atuando como receptores ionotrópicos que promovem a liberação de neurotransmissores (Wonnacott, 1997).

Estes receptores são canais iônicos pentaméricos, que quando ativados adquirem uma conformação de canal aberto permeável aos íons Na^+ e K^+ , e estão amplamente distribuídos no cérebro de humanos e roedores em todas as fases do desenvolvimento (Pentel et al., 2006; Broide & Leslie, 1999; Zoli et al. 1995). Os nAChRs são constituídos pelas subunidades homomérica ($\alpha 7$ - $\alpha 10$) e heteromérica ($\alpha 2$ - $\alpha 6$, $\beta 2$ - $\beta 4$). Cada nAChR consiste da união de 5 subunidades, sendo o subtipo homomérico constituído apenas das subunidades α e o subtipo heteromérico constituído pela união dos subtipos α e β . Essas combinações são responsáveis pela grande quantidade de receptores que irão desempenhar inúmeras ações importantes em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o desenvolvimento neuronal, ansiedade, aprendizado e memória (Dani et al., 2011; Dwyer et al., 2008; Dani et al., 2007; Bergink., 2004).

Como dito anteriormente, os nAChRs podem modular a liberação de neurotransmissores assim como a ação sináptica e atividade neural através de alterações em seus estados conformacionais (Dani et al, 2000). Também estão envolvidos nas vias de sinalização de dependência (Leslie et al, 2013; Dani & Balfours, 2011), estando amplamente distribuídos em áreas implicadas na dependência do tabaco (Gotti e Clementi 2004). A ativação destes receptores nestas regiões regula o sistema de neurotransmissores de monoaminas, particularmente a dopamina, que está fortemente envolvido em processos de recompensa e reforço de drogas (Albuquerque et al. 2009; Gotti et al. 2006).

A nicotina age sobre o sistema mesolímbico-dopaminérgico (Rosemberg, 2004). A via de recompensa cerebral é composta pela área tegmental ventral (VTA) e o núcleo accumbens (NAc). Esse sistema compreende os neurônios dopaminérgicos que se originam no VTA e liberam dopamina em regiões envolvidas com processamento da informação, memória e emoções, como o NAc, hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (CPF) (Little, 2000). Em humanos, a administração de nicotina através do fumo produz euforia, aumento da excitação, redução de fadiga e relaxamento (Henningfield et al., 1985). Esses efeitos desempenham papel importante na iniciação e na manutenção do fumo (Markou, 2008; Watkins et al., 2000). Várias outras espécies, como ratos e primatas não humanos, apresentam evidências comportamentais de reforço por administração de nicotina (Rose e Corrigan, 1997).

1.1.2 Dessensibilização e suprarregulação dos receptores nicotínicos

A dessensibilização pode ser definida como uma diminuição ou perda da resposta biológica em resposta a uma estimulação prolongada ou repetitiva. A dessensibilização é uma característica destes tipos de canais do tipo portão dependentes de neurotransmissores e representa uma forma de comportamento alostérico de proteínas, onde o receptor está distribuído entre um número discreto de conformações. Preferencialmente um ou mais estados dos receptores serão estabilizados pelos agonistas (Carr et al., 1989). Após a exposição a um agonista, o tempo de curso de dessensibilização será governado por taxas constantes de transição, mas de forma geral, devido aos estados dessensibilizados terem maior afinidade pelos agonistas, após um tempo, todos os receptores serão dessensibilizados (Wang e Sun, 2005). Para nAChRs, a dessensibilização pode ser descrita como um declínio na resposta à nicotina após uma exposição repetitiva à nicotina. O início da dessensibilização é tempo e concentração-dependente (Karlin, 2002; Garrido et al., 2001).

A suprarregulação (*upregulation* do original em inglês) de nAChRs pode ser definida como o aumento do número e/ou aumento da afinidade de nAChRs, e pode ser observada em cérebros de fumantes e animais expostos à nicotina. Abreu-Villaça e colaboradores (2003a), demonstrou que mesmo a exposição por curtos períodos, de apenas 2 dias, e com doses plasmáticas de nicotina que correspondem a fumar 2 cigarros, foi capaz de causar suprarregulação de nAChRs. Acredita-se que a suprarregulação constitui uma resposta celular à dessensibilização (Fenster et al., 1999). Contudo, não se sabe se as mudanças ocorridas são acompanhadas por um aumento de função dos receptores (Buisson e Bertrand, 2002). A tolerância à nicotina observada em fumantes, assim como os sintomas de abstinência, ocorre por dessensibilização e suprarregulação dos nAChRs após a exposição crônica à nicotina. Ao fumar, a concentração de nicotina que chega ao cérebro não é suficiente para gerar um potencial de ação comparado as concentrações fisiológicas de acetilcolina. No entanto, a nicotina não é degradada pela acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, e essa exposição prolongada da nicotina pode promover dessensibilização (Dani, 2001). O uso crônico da nicotina pode resultar no aumento dos receptores associados a uma desativação funcional; acredita-se que esse seja o mecanismo responsável pelos efeitos de dependência (Dani, 2001).

Os subtipos de receptores nicotínicos mais abundantes presentes no cérebro e que sofrem suprarregulação após exposição à nicotina, são o $\alpha 4\beta 2$ e o $\alpha 7$ (Abreu-Villaça et al., 2004a, 2003; Buisson e Bertrand, 2002). Cada subtipo de nAChR exhibe padrões distintos de

expressão e função em todo SNC e periférico (Gotti et al., 2006; Perry et al., 2002). O mais abundante subtipo neuronal é o $\alpha 4\beta 2$, que possui grande afinidade pela nicotina (Dani e Bertrand, 2007). Este receptor dessensibiliza em concentrações mais baixas de nicotina do que a requerida para a ativação (Fenster et al., 1999) e, como resultado, são mais dessensibilizados em cérebro de fumantes (Brody et al., 2006). Outro subtipo neuronal comum é a isoforma homomérica $\alpha 7$. Esta possui baixa afinidade por nicotina quando comparada com outros subtipos do receptor e dessensibiliza rapidamente em altas concentrações de nicotina (Dani & Bertrand, 2007; Albuquerque et al. 1998). Receptores que contêm as subunidades $\alpha 4$, $\beta 2$ e outras subunidades parecem ser a chave reguladora do sistema mesolímbico dopaminérgico, mediando a atividade induzida pela nicotina dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo no VTA (Leslie et al. 2013; Li et al. 2011; Zhao-Shea et al. 2011; Livingstone et al. 2009).

A exposição crônica à nicotina durante a adolescência produz alterações neuroquímicas e comportamentais que diferem das observadas na vida adulta. Estudos mostram que adultos são mais responsivos do que os adolescentes a suprarregulação dos sítios $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ nos nAChRs. Em contraste, os adolescentes apresentam maior infrarregulação dos nAChRs $\alpha 6$ do que os adultos (Doura et al., 2008; Collins et al., 2004).

1.1.3 Efeitos da retirada da nicotina

O uso crônico da nicotina induz neuroadaptações do sistema de recompensa do cérebro que resulta no desenvolvimento da dependência à nicotina. Alguns sintomas de abstinência ao cigarro podem ser descritos, tais como: depressão, ansiedade, irritabilidade, dificuldade de concentração, fissura, bradicardia, insônia, desconforto gastrointestinal e ganho de peso (Hughes et al., 1991; Shiffman e Jarvik, 1976). Ratos e camundongos exibem os sintomas de retirada da nicotina, como os humanos, incluindo os sintomas somáticos e os efeitos negativos (Malin et al., 2006; Watkins et al., 2000). Os efeitos somáticos da retirada da nicotina incluem elevações, saltos, constrições abdominais, mastigação, alongamentos e tremores faciais. O efeito negativo da retirada da nicotina caracteriza-se pela diminuição da capacidade de resposta a estímulos anteriormente gratificantes, chamado de anedonia.

Fumantes em abstinência são propensos à recaída por semanas, meses ou até mesmo anos após terem cessado o hábito de fumar. A retomada ao hábito de fumar, como a recaída

de outras drogas de abuso, muitas vezes ocorrem sobre a influência de pessoas, lugares, objetos ou outros estímulos que os indivíduos aprenderam a associar com os efeitos positivos de recompensa da droga (Hughes et al., 2004). Adicionalmente, adolescentes fumantes são mais propensos a relatar tolerância do que os adultos e apresentam maiores taxas de dependência do que os adultos, mesmo embora os adolescentes fumem menos cigarros por dia comparados aos adultos (Kandel, 2000).

1.2 Desenvolvimento do sistema nervoso central

O período de formação do cérebro é mais longo que o de outros órgãos, e seu desenvolvimento continua até a adolescência. O aumento da capacidade cognitiva durante a adolescência coincide com uma diminuição da espessura da camada cortical cinzenta, resultante da perda de sinapses e fortalecimento das conexões remanescentes (Paus, 2010; Gogtay & Thompson, 2010; Ostby et al. 2009). O volume e a densidade da substância cinzenta diminui em algumas regiões, como o córtex pré-frontal, o córtex parietal e os gânglios da base, estruturas que são fundamentais para a função executiva, o processamento sensorial e comportamentos motivados (Sowell et al., 1999, 2001; Giedd et al., 1999). A redução do volume do córtex pré-frontal é observado tanto em humanos (Jernigan et al., 1991) quanto em ratos (Van Eden et al., 1990). Entretanto, na substância branca ocorre um aumento da mielinização e do diâmetro axonal, resultando num aumento na velocidade de condução do impulso nervoso (Paus, 2010).

As mudanças que ocorrem nas substâncias cinzenta e branca não são homogêneas em todo o cérebro, diferindo regionalmente, com as regiões filogeneticamente mais antigas amadurecendo mais cedo do que as mais recentes (Gogtay et al., 2004). A dessincronização entre a maturação da região subcortical envolvida com a emoção e o sistema de recompensa e a área envolvida com as funções executivas e o controle do impulso é tida como a responsável pela propensão ao comportamento de risco em adolescentes (Smith 2013; Casey et al., 2011). As pronunciadas mudanças estruturais e neuroquímicas durante a adolescência estão em paralelo com o aumento da conectividade funcional, que desempenham um papel significativo no desenvolvimento do controle cognitivo (Luna et al., 2010).

1.3 Adolescência

A adolescência é um período de transição da infância para a idade adulta. Em humanos, a adolescência se estende dos 12 aos 18 anos de vida (Spear, 2000). O período em que um roedor é considerado adolescente varia bastante entre os estudos (Yetnikoff et al., 2013). Em roedores, como ratos e camundongos, as primeiras alterações associadas à adolescência podem ocorrer a partir do 20º dia de vida pós-natal (PN20) e as últimas mudanças podem ocorrer até PN55. Em roedores, a adolescência pode ainda ser dividida em precoce (PN24 a 35), média (PN37 a 48) e tardia (PN50 a 61) (Adriani et al., 2002a).

Humanos e roedores exibem alterações fisiológicas e comportamentais semelhantes (Spear 2013; 2007). A adolescência não apresenta eventos óbvios que sinalizem o seu início ou fim, assim como deve ser considerado que, em humanos, diferenças socioculturais influenciam o momento e a duração deste período (Yuan et al., 2015). Muitos autores definem a adolescência como um período de maturação sexual, ou puberdade. A puberdade é temporalmente restritiva, com duração de cerca de 5 anos em seres humanos (Sun et al, 2002) e 10-20 dias em roedores (Schneider, 2013; Sisk e Zehr, 2005). Entre os humanos, o início da puberdade é considerado como o início da adolescência, porém, como já dito, o início pode variar amplamente dependendo do sexo, status socioeconômico e estado nutricional (Spear, 2000).

Variações relacionadas com o sexo durante a puberdade também são observadas em ratos (Schneider 2013; Varlinskaya et al., 2013; Vetter-O'Hagen e Spear, 2012), e o pico de busca pela novidade observado durante a adolescência parece ser independente das alterações hormonais gonadais (Vetter-O'Hagen e Spear, 2012). Indivíduos adolescentes e adultos diferem comportamentalmente. Em humanos, a adolescência é caracterizada por traços comportamentais como labilidade emocional, impulsividade e comportamento de risco, que estão associadas com o aumento de vulnerabilidade para transtornos neuropsiquiátricos, incluindo doenças afetivas e dependência (Volkow e Li, 2005; Andersen, 2003; Teicher et al., 2003; Wallace et al., 2003; Spear, 2000; Arnett, 1999).

Roedores também apresentam traços comportamentais característicos da adolescência, tais como: elevados níveis de busca pela novidade (Adriani et al., 1998), impulsividade (Adriani e Laviola, 2003) e comportamento de risco (Macri et al., 2002), assim como redução de resposta ao estresse (Adriani e Laviola, 2000).

1.4 Nicotina e comportamento

Diversos estudos demonstraram que a nicotina é uma substância neuroteratogênica que exerce, a longo prazo, efeitos na maturação em fases críticas do desenvolvimento do cérebro (Dwyer et al., 2008, 2009; Ginzler et al., 2007; Slotkin, 2004). A adolescência é um período sensível de maturação de circuitos do cérebro que regulam a cognição e a emoção, e conseqüentemente é um período de vulnerabilidade aos efeitos da nicotina e tabaco. Desta forma, o cérebro adolescente imaturo possui diferentes sensibilidades a drogas e a exposição à nicotina durante esse período da vida pode promover alterações a longo prazo em circuitos neurais e também no comportamento (Yuan et al., 2015).

Os efeitos da exposição à nicotina durante a adolescência diferem dos indivíduos adultos. Estudos com roedores demonstraram que a nicotina produz respostas comportamentais específicas por idade. A exposição aguda à nicotina aumenta a atividade locomotora em adolescentes, porém reduz a atividade em adultos (Cao et al., 2010). E também reduz a ansiedade em ratos machos adolescentes (Cao et al., 2010; Elliott et al., 2004; Cheeta et al., 2001). Além disso, adolescentes apresentam um maior efeito gratificante da nicotina, como observado no teste de preferência condicionada pelo lugar (*conditioned place preference test* do original em inglês) (Torres et al., 2008; Brielmaier et al., 2007; Kota et al., 2007; Vastola et al., 2007; Shram et al., 2006; Belluzzi et al., 2004) e exibem maior vulnerabilidade a autoadministração oral de nicotina durante a adolescência precoce (Adriani et al., 2002).

Estudos apontam que ratos adolescentes desenvolvem rapidamente o hábito de autoadministrar nicotina e que os adolescentes consomem mais nicotina quando comparados aos adultos (Natividad et al. 2013; Chen et al. 2007; Levin et al. 2007). Em contraste, adolescentes demonstram menor aversão à nicotina do que os adultos (Torres et al., 2008; Shram et al., 2006; Adriani et al., 2002) e menos sintomas de abstinência seguido da exposição crônica (Shram et al., 2008; O'Dell et al., 2006). Essas mudanças entre os efeitos positivos e negativos da nicotina, que ocorrem durante a adolescência, podem ser o motivo da vulnerabilidade ao tabagismo e ao uso de cigarros.

A exposição crônica à nicotina durante a adolescência tem conseqüências a longo prazo sobre o comportamento e a cognição. Adolescentes expostos à nicotina apresentam diminuição da capacidade cognitiva, assim como os adultos, com redução de atenção e aumento da impulsividade (Counotte et al., 2011; Counotte et al., 2009; Trauth et al., 2000). Ratos adolescentes exibem aumento no comportamento exploratório e na busca de novidade em

relação a ratos em outras idades (Spear 2000; Spear et al, 1980). Adicionalmente, estudos do nosso laboratório demonstraram que a nicotina está relacionada com alterações comportamentais como os associados aos níveis de ansiedade, memória e aprendizado e busca por novos estímulos (Abreu-Villaça et al., 2006; 2007; 2008). Além disso, respostas emocionais a longo prazo também são observados, com aumento da ansiedade e medo (Smith et al., 2006; Slawecki et al., 2003). Adicionalmente, a exposição à nicotina durante a adolescência, pode resultar em um estado de depressão na idade adulta, que é normalizado pelo tratamento com nicotina ou com antidepressivos (Iñiguez *et al.* 2009).

1.4.1 Ansiedade

A ansiedade é um sintoma comum de dependência física e sintoma de retirada de diversas drogas, incluindo o tabaco. Algumas evidências corroboram a noção de que a ansiedade é um fator que aumenta a probabilidade de iniciar o hábito de fumar (Morissette et al., 2007). Estudos com fumantes adultos mostraram que o tabaco pode reduzir a ansiedade, sendo que este efeito é normalmente atribuído à nicotina presente nos cigarros (Kassel e Unrod, 2000). Desta forma, sugere-se que os fumantes continuam o hábito de fumar a fim de regular seu estado de ansiedade (Pcciotto et al 2002; Gilbert et al, 1998; Pomerleau, 1986). Apesar de ser sugerido que a ansiedade também é um sintoma de retirada da nicotina (Parrot 2003; Hughes et al, 2000a), ao contrário do observado em indivíduos adultos, adolescentes fumantes relatam aumento nos níveis de ansiedade durante a exposição ao cigarro.

Estudos em roedores têm demonstrado que a nicotina pode ter efeito ansiolítico, ansiogênico ou não causar alterações nos níveis de ansiedade (Irvine et al 1999; 2001a;b; Ouagazzal et al, 1999; Bioni et al, 1993). Estas diferenças dependem da dose utilizada, idade, sexo, via de administração e modelo experimental utilizado (Elliot et al, 2004; Picciotto et al, 2002; Cheeta et al, 2001; 2001b; Dayas et al., 2001a; Szyndler et al., 2001; Ouagazzal et al., 1999; Vale and Green, 1996; Brioni et al., 1993; Costall et al., 1989).

Utilizando um modelo de exposição à nicotina durante a adolescência (PN30 a PN45) através da água de beber em camundongos, Abreu-Villaça e colaboradores (2008) demonstraram os efeitos de curto e longo prazo da exposição à nicotina. Neste estudo foi observado uma tendência de efeito ansiolítico da nicotina durante a exposição. Durante um curto período de retirada da droga (PN50) foi observado efeitos sexo-dependentes onde a

exposição à nicotina foi ansiogênica apenas para as fêmeas. Após um período longo de retirada (PN75) não foram observados efeitos da nicotina.

1.4.2 Atividade locomotora

Outro comportamento afetado pela nicotina é a atividade locomotora. Como já descrito anteriormente, alguns autores demonstraram efeitos depressores em ratos adultos, enquanto em adolescentes a atividade locomotora é estimulada pela nicotina (Belluzzi et al., 2004; Elliot et al., 2004; Vastola et al., 2002). Falco e cols. (2014) demonstraram através de uma única injeção de nicotina que adolescentes jovens apresentaram aumento da atividade locomotora, enquanto que durante a adolescência tardia e vida adulta foi observado uma redução da atividade locomotora. Assim como observado na ansiedade, os efeitos da nicotina na locomoção dependem da dose, sexo, via de administração, idade estudadas. Diferentes doses de nicotina podem promover diferentes efeitos. Administração aguda de nicotina pode causar redução da atividade locomotora, porém esse efeito é dose-dependente, e a administração crônica pode aumentar a atividade locomotora (Zarrindast et al., 2012; Cohen et al., 2009; Irvine et al., 2001; File et al., 2000; Brioni et al., 1993; Costall et al., 1989). Efeitos dependentes do sexo também foram observados: as fêmeas são mais sensíveis do que os machos aos efeitos locomotores da nicotina, tanto em ratos adolescentes quando nos adultos (Elliott et al., 2004; Kanyt et al., 1999).

1.5 **Nicotina e função adrenal**

A exposição à nicotina produz mudanças neuroendócrinas (Tziomalos e Charsoulis, 2004), e a nicotina é um potente ativador do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Balfour, 1989). A resposta do organismo ao estresse resulta na ativação do eixo HPA e do sistema nervoso simpático (Bugajski, 1999). As glândulas adrenais são componentes fundamentais do sistema endócrino, contribuindo de modo significativo para a manutenção da homeostase devido ao seu papel na regulação da resposta adaptativa do organismo ao estresse. Os principais hormônios produzidos por essas glândulas nos seres humanos pertencem a duas

famílias diferentes, com base em sua estrutura: os hormônios esteroides (glicocorticoides, mineralocorticoides e androgênios) e as catecolaminas, noradrenalina e adrenalina (Molina, 2014).

As adrenais estão localizadas no retroperitônio, acima dos rins (Guyton e Hall, 1996). Cada glândula é formada por uma porção mais externa, o córtex adrenal, que sintetiza hormônios esteroides em resposta à estimulação hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; e uma porção mais interna, a medula adrenal, que sintetiza as catecolaminas em resposta à estimulação simpática (simpatoadrenal) (Molina, 2014). As adrenais recebem um dos maiores fluxos sanguíneos do organismo em função da sua elevada produção hormonal. O sangue arterial de capilares do córtex é drenado para vênulas da medula, que, portanto, é exposta a relativamente altas concentrações de hormônios esteroides (Navegantes et al., 1999d). O córtex da adrenal consiste em três zonas, as quais variam em suas características morfológicas e funcionais e, portanto, nos hormônios esteroides que produzem: a zona glomerulosa (mais externa) que secreta o mineralocorticoide a aldosterona, a zona fasciculada (região média) que secreta glicocorticóides e a zona reticular (mais interna) que secreta os andrógenos (Molina, 2014; Navegantes et al., 1999c).

A secreção do córtex da adrenal é regulada pelo eixo hipotálamo-hipofisário (Guyton e Hall, 1996). Um estímulo, como por exemplo, estresse e/ou nicotina, chega ao hipotálamo e estimula a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) para o sistema porta-hipofisário, que atua nos corticotrofos da adenoipófise estimulando a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que chega a corrente sanguínea e age no córtex da adrenal estimulando, principalmente, a secreção dos glicocorticóides (Pauly et al., 1992), cortisol em humanos e corticosterona em roedores.

A medula da adrenal pode ser considerada um gânglio do sistema nervoso simpático, que, em resposta à estimulação dos neurônios simpáticos pré-ganglionares, à liberação de acetilcolina (ACh) e a sua ligação a um receptor colinérgico nas células cromafins, estimula a produção e a liberação de catecolaminas plasmáticas: adrenalina (80% do produto da secreção) e noradrenalina (20%) (Molina, 2014). Os receptores nAChRs expressos nas células cromafins da medula adrenal de humanos são compostos pelas subunidades $\alpha 6$ e $\beta 4$ e estas subunidades controlam principalmente a exocitose (Pérez-Alvarez et al., 2012). As catecolaminas são sintetizadas a partir do aminoácido tirosina. A maior parte da tirosina é obtida da dieta, e uma pequena proporção também pode ser sintetizada no fígado a partir da fenilalanina (Guyton e Hall, 1996).

A tirosina presente na circulação sanguínea, entra na célula cromafim e sofre hidroxilação em 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) pela enzima tirosina hidroxilase (TH). Essa enzima representa o principal ponto de controle na síntese das catecolaminas. Em seguida, a L-DOPA é descarboxilada pela enzima dopa-decarboxilase (DOPA-d) em dopamina (DA) no citoplasma. A DA entra para os grânulos cromafins, e é convertido em noradrenalina (NA) através da ação da dopamina β -hidroxilase (D β H). Nas células adrenérgicas, a NA pode ser transportada para o citoplasma para ser convertida então em adrenalina (AD) pela enzima feniletanolamina N-metiltransferase (FNMT). A adrenalina é transportada para o interior do grânulo e armazenada até ser secretada (Guyton e Hall, 1996). Os produtos finais da via (AD ou NA) inibem a TH, atuando como um mecanismo regulatório da via. Além disso, a TH também sofre modificações alostéricas por fosforilação em serina (Guyton e Hall, 1996). Os glicocorticóides encontram-se em altas concentrações em torno das células ganglionares da medula adrenal. Constituem um dos principais estimuladores da síntese da FNMT e, conseqüentemente, da síntese de adrenalina (Navegantes et al., 1999b). A nicotina estimula o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal aumentando os níveis de glicocorticóides (Pauly et al., 1992).

A nicotina aumenta a produção e liberação de catecolaminas na medula adrenal (Sala et al., 2008). Atuando como um agonista exógeno da acetilcolina, podendo assim ativar os receptores nicotínicos (Wakade e Wakade, 1983), incluindo os que estão presentes na medula adrenal. A literatura descreve que a administração crônica de nicotina aumenta de forma dose dependente a atividade e os níveis de RNA mensageiro (RNAm) para TH (Sun e Tank, 2002). Em ratos, foi observado que a infusão de nicotina durante 14 dias consecutivos elevou os níveis de RNAm para TH na adrenal, e não foi observado redução de corticosterona plasmática (Cheng et al., 2005). Os níveis plasmáticos de adrenalina são aumentados em fumantes em relação a cada cigarro fumado (Roseland et al., 2005). Adicionalmente, a nicotina aumenta os níveis plasmáticos de corticosterona (Matta et al., 1998; Cam and Bassett, 1983; Balfour et al., 1975).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo procurou avaliar dois parâmetros comportamentais frequentemente associados ao uso e retirada do cigarro, níveis de ansiedade e atividade locomotora, em um modelo experimental de exposição à nicotina durante a adolescência ou vida adulta. Adicionalmente, o projeto procurou avaliar alterações na função da glândula adrenal, tendo em vista que alterações nestes comportamentos podem estar associadas a disfunções desta glândula.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os comportamentos associados à ansiedade através do teste do Labirinto em Cruz Elevado;
- b) Avaliar os comportamentos associados à atividade locomotora através do teste do Campo Aberto;
- c) Analisar o conteúdo adrenal de catecolaminas totais através do método fluorimétrico do trihidroxiindol;
- d) Analisar a expressão da enzima tirosina hidroxilase na adrenal através de Western blotting;
- e) Analisar as concentrações séricas de corticosterona através de radioimunoensaio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados 462 camundongos Suíços de 59 ninhadas (tabela 1). Os animais foram criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro num ciclo diário de 12 horas claro/escuro (claro a partir das 13:00), temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e com livre acesso à água filtrada (exceto quando indicado) e comida (ração comercial padrão para roedores). O protocolo experimental utilizado, descrito a seguir, foi aprovado pelo Comitê de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes (IBRAG), sob o número CEUA/037/2014 e estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelos Institutos Nacionais de Saúde (*National Institutes of Health* - NIH) dos E.U.A.

Para a formação das ninhadas foram utilizados camundongos adultos, os acasalamentos foram realizados com pareamento de três fêmeas para um macho. À medida que a gravidez era constatada, as fêmeas grávidas eram separadas em gaiolas individuais e observadas diariamente até o dia do nascimento da prole, considerado como o 1º dia pós-natal (PN1). Neste estudo foram utilizadas ninhadas entre 8 e 12 filhotes com o objetivo de padronizar o aporte nutricional. O desmame foi realizado em PN25, momento em que cada ninhada foi separada da respectiva progenitora. Em PN30 os animais foram separados por sexo e grupo experimental. Em nenhum momento ao longo do estudo, animais foram alojados isoladamente no biotério: no mínimo dois animais da mesma ninhada e do mesmo sexo foram mantidos por gaiola para evitar os efeitos deletérios do isolamento.

Tabela 1 – Número de animais utilizados no projeto por idade, período, sexo e tipo de avaliação

Avaliação	Exposição	Sexo	Adolescente			Adulto			Adolescente			Adulto		
			VIG	RET5	RET10	VIG	RET5	RET10	VIG	RET5	RET10	VIG	RET5	RET10
Labirinto em cruz elevado	SAC	<i>Variáveis principais</i>						<i>Variáveis etológicas</i>						
		Fêmea	11	10	11	9	9	7	11	10	10	9	8	7
		Macho	13	9	10	7	9	11	11	9	9	7	9	10
	Total	24	19	21	16	18	18	22	19	19	16	17	17	
	NIC	Fêmea	12	10	11	8	7	7	12	10	11	8	8	7
		Macho	12	10	9	9	8	8	11	8	9	9	9	7
Total		24	20	20	17	15	15	23	18	20	17	17	14	
Campo aberto	SAC	<i>Variáveis principais</i>						<i>Variáveis etológicas</i>						
		Fêmea	9	9	8	9	7	7	11	10	9	9	9	7
		Macho	13	9	7	8	8	11	13	8	7	8	8	11
	Total	22	18	15	17	15	18	24	18	16	17	17	18	
	NIC	Fêmea	13	9	8	8	9	7	13	9	7	8	11	7
		Macho	12	7	12	8	9	8	12	8	10	9	10	8
Total		25	16	20	16	18	15	25	17	17	17	21	15	
Catecolamina	SAC	<i>Animais não testados comportamentalmente</i>						<i>Animais testados comportamentalmente</i>						
		Fêmea	6	6	11	8	4	6	6	7	8	6	8	6
		Macho	8	7	8	7	6	8	7	9	4	4	9	10
	Total	14	13	19	15	10	14	13	16	12	10	17	16	
	NIC	Fêmea	9	8	8	6	7	8	7	9	8	6	10	6
		Macho	6	9	9	7	8	5	5	7	9	7	11	6
Total		15	17	17	13	15	13	12	16	17	13	21	12	
Corticosterona	SAC	<i>Animais não testados comportamentalmente</i>						<i>Animais testados comportamentalmente</i>						
		Fêmea	8	8	9	9	5	4	6	8	8	7	9	6
		Macho	10	7	10	5	8	10	6	7	7	4	9	9
	Total	18	15	19	14	13	14	12	15	15	11	18	15	
	NIC	Fêmea	12	6	7	7	6	8	6	11	7	7	9	7
		Macho	6	8	9	8	6	8	7	6	8	9	8	9
Total		18	14	16	15	12	16	13	17	15	16	17	16	
Tirosina hidroxilase	SAC	<i>Animais não testados comportamentalmente</i>												
		Fêmea	4	6	5	6	4	4						
		Macho	7	5	5	5	5	5						
	Total	11	11	10	11	9	9							
	NIC	Fêmea	6	6	6	5	7	6						
		Macho	5	5	7	5	5	7						
Total		11	11	13	10	12	13							

Legenda: Os números indicam o tamanho da amostra em cada condição. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: animais avaliados durante a vigência; RET5: animais avaliados após uma retirada de 5 dias; RET10: animais avaliados após uma retirada de 10 dias. Em relação aos testes comportamentais, as amostras são apresentadas separadamente para as variáveis principais e para as variáveis etológicas de cada teste. As amostras das avaliações hormonais são apresentadas separadas em função do animais ter sido ou não previamente submetido aos testes comportamentais.

Fonte: A autora, 2016.

3.2 Grupos experimentais

Este projeto foi conduzido com animais iniciando os procedimentos de exposição durante a adolescência ou durante a vida adulta (grupos diferentes de animais foram utilizados em cada idade). Após a determinação da idade em que seriam conduzidos os procedimentos experimentais, os animais foram separados em dois grupos de exposição: grupo Sacarina (SAC) e grupo Nicotina (NIC). O período de exposição na adolescência iniciou-se em PN30 e estendeu-se a PN46, período aproximado no qual os camundongos de ambos os sexos exibem características comportamentais típicas da adolescência e padrões neuroquímicos e endócrinos que se diferenciam dos observados na vida adulta e na pré-puberdade (Spear, 2000c). O período de exposição na vida adulta iniciou-se em PN75 e estendeu-se a PN91. Durante o período da exposição os bebedouros eram preenchidos, em função do grupo experimental, ou com uma solução aquosa contendo 20 ml de sacarina 2% (SAC) ou com uma solução aquosa contendo nicotina *free base* (50 µg/ml) diluída em solução de sacarina 2% (NIC). As soluções contidas nos bebedouros foram substituídas a cada 24 h. Após o período da exposição e durante os períodos de retirada (5 e 10 dias; ver adiante) os bebedouros foram preenchidos com água filtrada. O protocolo de exposição à nicotina do presente estudo (incluindo a dose utilizada) vem sendo empregado com sucesso no laboratório desde 2004, tendo resultado em diversas publicações (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007, 2008; Ribeiro-Carvalho et al., 2009, 2011). Este protocolo é fácil de ser implementado, tem custo baixo quando comparado a outros métodos de exposição à nicotina (via fumaça do cigarro, por exemplo), é bem tolerado pelos animais, o consumo é feito principalmente durante a fase ativa dos animais (tal como em humanos) e apresenta níveis de exposição consistentes.

Além da análise realizada em duas idades diferentes (adolescência e adulta), em cada idade, as avaliações comportamentais e endócrinas foram feitas em 3 períodos diferentes (animais diferentes em cada período): 1) uma parte dos animais foi avaliada durante o último dia de exposição (VIG); 2) uma outra parte foi avaliada após 5 dias de retirada (RET5) da solução de nicotina ou solução de sacarina; 3) uma última parte foi avaliada após 10 dias de retirada (RET10). Assim sendo, o presente estudo envolveu análises dos efeitos comportamentais e endócrinas (descritas em detalhes adiante) da exposição à nicotina (animais SAC e NIC) em duas idades distintas (animais adolescentes e adultos), em três períodos diferentes (VIG, RET5 e RET10) em cada idade e nos dois sexos. O quadro 1

apresenta os grupos utilizados no presente estudo e a figura 1 apresenta a linha do tempo do estudo.

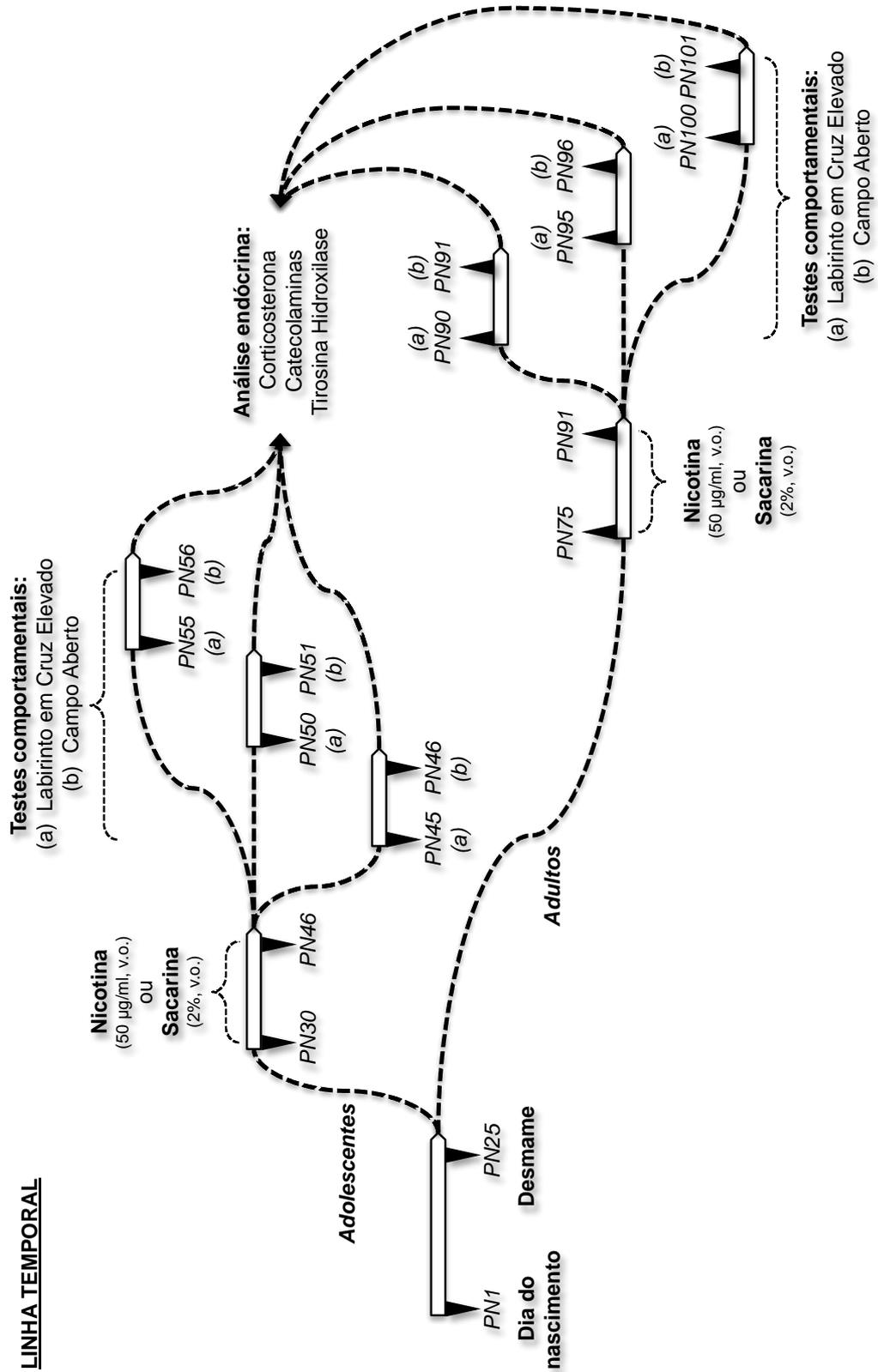
Tendo como objetivo avaliar os efeitos endócrinos da exposição à nicotina sem as possíveis interferências resultantes da realização prévia de testes comportamentais, adicionalmente, foram avaliados os parâmetros endócrinos de um grupo de animais que não havia sido submetidos anteriormente à avaliação comportamental.

Quadro 1 – Grupos avaliados no projeto

GRUPOS										
#	Idade	Exposição	Período	Sexo		#	Idade	Exposição	Período	Sexo
1	ADOL	SAC	VIG	F		13	ADULT	SAC	VIG	F
2				M		14				M
3			RET5	F		15			RET5	F
4				M		16				M
5			RET10	F		17			RET10	F
6				M		18				M
7	NIC	VIG	F	19		NIC	VIG	F		
8				M				20		M
9			RET5	F			21		RET5	F
10				M			22			M
11			RET10	F			23		RET10	F
12				M			24			M

Legenda: ADOL: animais expostos na adolescência; ADULT: animais expostos adultos SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: animais avaliados durante a vigência; RET5: animais avaliados após uma retirada de 5 dias; RET10: animais avaliados após uma retirada de 10 dias; F: fêmeas; M: machos.

Figura 1 – Linha do tempo do estudo



Legenda: Esquema mostrando a linha temporal utilizada no estudo.
 Fonte: A autora, 2016.

3.3 Consumo líquido e massa corporal

A ingestão de líquido foi medida a cada 24 h durante a etapa de exposição. Para estimar os efeitos causados por gotejamento e evaporação nos volumes medidos, uma gaiola sem animais com um bebedouro preenchido de solução foi utilizada para medir diariamente as perdas não associadas ao consumo. Estas perdas foram subtraídas dos valores de consumo obtidos em cada gaiola.

A massa corporal dos animais foi também medida a cada 4 dias durante os períodos de exposição e retirada. Para tanto, os animais foram individualmente retirados da gaiola e colocados em um recipiente apropriado em cima de uma balança digital (precisão em centigramas). O valor da massa foi anotado assim que o animal ficava voluntariamente imóvel dentro do recipiente, não levando o procedimento mais do que 30 segundos. O recipiente foi lavado com uma solução de álcool (50%) e secado sempre que se notava resíduo de urina ou fezes, e sempre entre as medidas feitas com animais de gaiolas diferentes.

3.4 Testes comportamentais

Antes do início dos testes, as gaiolas dos animais foram transportadas para a sala de teste, onde os animais foram ambientados por 10 min. Foram realizados dois testes comportamentais em dois dias consecutivos. Os animais foram primeiramente submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE). No dia seguinte, esses animais foram submetidos ao teste do campo aberto (CA).

Tal como indicado anteriormente, os animais adolescentes foram submetidos ao LCE em um dos seguintes períodos: durante a exposição, em PN45; com cinco dias após o término da exposição, em PN50; ou com dez dias após o término da exposição, em PN55. Para o CA, os animais adolescentes foram testados em um dos seguintes períodos: durante a exposição, em PN46; com seis dias após o término da exposição, em PN51; ou com dez dias após o término da exposição, em PN56. Os animais adultos foram submetidos ao LCE em um dos seguintes períodos: durante a exposição, em PN90; com cinco dias após o término da exposição, em PN95; ou com dez dias após o término da exposição, em PN100. Para o CA, os animais adultos foram testados em um dos seguintes períodos: durante a exposição, em PN91;

com seis dias após o término da exposição, em PN96; ou com dez dias após o término da exposição, em PN101.

3.4.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os animais foram testados no LCE (figura 2; *elevated plus maze* no original em inglês), que é considerado como um dos melhores testes para análise de ansiedade em modelos experimentais, sendo frequentemente utilizado para a avaliação do efeito de drogas ansiolíticas (Sala-Roca et al., 2002; Carobrez e Bertoglio, 2005). O labirinto em cruz elevado é construído em acrílico preto, e é constituído por 4 braços, 2 abertos (sem paredes - BA), medindo $28,5 \times 5$ cm, e 2 fechados (com paredes - BF), medindo $28,5 \times 5 \times 14$ cm, dispostos perpendicularmente, e uma área central (CN) entre os braços (em forma de cruz), elevados 50 cm acima do chão.

Figura 2 – Labirinto em cruz elevado



Legenda: Foto em vista superior-obliqua do labirinto em cruz elevado
Fonte: A autora, 2016.

Os camundongos foram colocados individualmente no centro do equipamento, virados para um dos braços abertos, tendo 5 min para explorar o labirinto. Após o término de cada teste, o LCE era limpo com um pano umedecido com solução alcoólica (50%) com o intuito de eliminar as excretas e minimizar odores que pudessem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados. Os testes foram realizados na fase escura do biotério, numa

sala com proteção acústica e gravados com uma câmera digital posicionada a 1 m acima do labirinto para posterior análise.

A partir das imagens gravadas, foram quantificados o tempo (em milissegundos) de permanência dos animais nos braços abertos, nos braços fechados e na área central, assim como o número de entradas em cada uma destas estruturas; para tal foi utilizado o programa ACC PlusM 102 - Avaliação Computadorizada de Comportamento (desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia / DCF / IBRAG / UERJ). As seguintes variáveis principais associadas aos níveis de ansiedade (Lal et al., 1991; Pellow et al., 1985a) foram utilizadas: 1) Tempo gasto nos braços abertos (Tempo BA) – medido a partir do momento que o animal colocava as quatro patas no braço aberto. A contagem era interrompida quando o animal retirava as quatro patas do braço aberto; 2) Percentual de tempo nos braços abertos (%Tempo BA) – calculado a partir da razão entre o tempo gasto nos braços abertos (Tempo BA) e a soma dos tempos gastos nos braços abertos e fechados (Tempo BA+BF): $\% \text{Tempo BA} = \text{Tempo BA} / \text{Tempo BA+BF}$; 3) Entradas nos braços abertos (Entradas BA) – Foram contadas como entradas todas as vezes em que o animal colocava as quatro patas no braço aberto; 4) Percentual de entradas nos braços abertos (%Entradas BA) – calculado a partir da razão entre o número de entradas nos braços abertos e a soma do número de entradas nos braços abertos e braços fechados (Entradas BF): $\% \text{Entradas BA} = \text{Entradas BA} / \text{Entradas BA} + \text{BF}$; 5) Percentual de tempo gasto no centro do labirinto (%Tempo CN): foi usado como uma medida independente de tomada de decisão e correspondia ao tempo gasto no centro dividido pelo tempo total (Rodgers e Dalvi, 1997); 6) Entradas nos braços fechados (Entradas BF): Foram contadas como entradas todas as vezes em que o animal colocava as quatro patas no braço fechado. Esta variável foi considerada como medida independente de atividade. As variáveis etológicas utilizadas foram: 1) número de elevações sobre as patas traseiras (atividade vertical); 2) o número de autolimpezas (tomada de decisão); 3) número de alongamentos (avaliação de risco); 4) o número de explorações com a cabeça (quando esta era colocada abaixo do plano dos braços) cabeça (avaliação de risco).

3.4.2 Campo Aberto (CA)

O teste de campo aberto (figura 3; *open-field* no original em inglês) foi desenvolvido originalmente por Hall (1934) e é largamente utilizado para avaliar a ansiedade e a atividade locomotora (Matsuo et al., 2010; Sansar et al., 2010; Filgueiras et al., 2009; Zubkov e Kulikov, 2009; Elliott et al., 2005; Elliott e Grunberg, 2005; Choleris et al., 2001). A arena do campo aberto utilizada consiste em uma caixa preta (45 x 45 x 45 cm) cujo fundo é dividido em 16 retângulos iguais (12 periféricos e 4 centrais). Entre os retângulos periféricos, foram considerados como sendo da borda aqueles que não compreendiam os vértices (esquinas) da arena. Os dois tipos de retângulos periféricos foram contados separadamente.

Figura 3 – Foto em vista superior-oblíqua do Campo aberto



Legenda: Foto em vista superior-oblíqua do campo aberto

Fonte: A autora, 2016.

Os camundongos foram posicionados individualmente com a cabeça voltada para um dos quatro cantos do equipamento, tendo 5 min para explorar o campo aberto. Após o término de cada teste, o CA era limpo com um pano umedecido com solução alcoólica (50%) com o intuito de eliminar as excretas e minimizar odores que pudessem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados. Os testes foram realizados na fase escura do biotério, numa sala com proteção acústica e gravados com uma câmera digital posicionada a 1 m acima da arena para posterior análise.

A partir das imagens gravadas, foram quantificados o tempo (em milisegundos) de permanência dos animais em cada área do equipamento, assim como a ambulação com base no número de retângulos cruzados pelo animal ao longo do teste. Um cruzamento foi contado sempre que o animal passava completamente com as quatro patas por um retângulo. O tempo em um retângulo era medido a partir do momento em que o animal entrava com as quatro patas em seu interior. Para as contagens, foi utilizado o programa ACC HB Ultra Avaliação Computadorizada de Comportamento (desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia / DCF / IBRAG / UERJ). As seguintes variáveis principais foram utilizadas: 1) Ambulação no centro (Amb C) (ansiedade); 2) Ambulação na esquina (E); 3) Ambulação na borda (Amb B); 4) Ambulação total (Amb TOT = C + E + B) (locomoção); 5) Tempo gasto no centro (Tempo C) (ansiedade); 6) Tempo gasto na esquina (Tempo E); 8) Tempo gasto na borda (Tempo B); 7) Tempo gasto na periferia (Tempo Pe = Tempo E + B). As variáveis etológicas utilizadas foram: 1) número de elevações sobre as patas traseiras (atividade vertical); 2) o número de autolimpezas (tomada de decisão); 3) número de alongamentos (avaliação de risco).

3.5 Coleta de tecidos

Duas horas após o término dos testes no CA, os animais foram sacrificados e os tecidos foram retirados para posterior análise. Os tecidos coletados para a determinação dos parâmetros endócrinos foram: adrenal esquerda e direita (para determinação do conteúdo de catecolaminas e expressão da tirosina hidroxilase respectivamente), e sangue para dosagem de cotinina e de corticosterona. Os animais que não foram submetidos aos testes comportamentais foram sacrificados dentro do mesmo período. Após a retirada dos tecidos, as amostras obtidas foram imediatamente congeladas e armazenadas a -80°C para posterior análise. As amostras do sangue foram centrifugadas ($8.848\times\text{g} / 20 \text{ min}, 4^{\circ}\text{C}$) para a obtenção do soro, que foi mantido em freezer a -20°C até a dosagem de cotinina e de corticosterona.

3.6 Dosagem de cotinina

Amostras de soro foram utilizadas para a dosagem de cotinina por Elisa imunoensaio (Sierra Resources International, E.U.A.). A cotinina é um metabólito da nicotina que é frequentemente utilizado para estimar a intensidade da exposição (Caraballo et al., 2004a, Kyerematen e Vesell, 1991).

3.7 Determinação do conteúdo adrenal de catecolaminas totais

Para extrair o conteúdo de catecolaminas totais (adrenalina e noradrenalina), as glândulas adrenais esquerdas foram homogeneizadas em 200 μ l de ácido acético 10%. Os homogenatos foram centrifugados (1.120 \times g / 5 min) e os sobrenadantes foram analisados pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol (Trevenzoli et al., 2007b).

Para a realização do ensaio, utilizamos padrões de adrenalina (Adren®) diluída em ácido acético 10%. Em 50 μ l de cada padrão ou amostra, adicionamos 250 μ l de tampão fosfato (0,5 M, pH 7,0) e 25 μ l de ferricianeto de potássio (0,5%). Esta mistura foi incubada por 20 min e a reação paralisada com 500 μ l de ácido ascórbico (60 mg/ml) / NaOH (5 N), na proporção 1:19.

Adicionamos 2 ml de água destilada e a solução foi novamente homogeneizada e submetida à leitura em espectrofluorímetro (Plate CHAMELEON V - Hidex, Turku, Finlândia). Os comprimentos de onda para a leitura foram de 420 nm de excitação e 510 nm de emissão. Os resultados foram obtidos a partir da regressão linear da curva padrão de adrenalina e os dados de catecolaminas foram expressos em μ M/mg de tecido. Todas as dosagens foram feitas em duplicata, com os tubos de ensaio sob refrigeração durante todo o procedimento.

3.8 Análise da expressão de proteínas por Western blotting

Avaliamos o conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) na adrenal direita. As adrenais foram homogeneizadas em 200 µl de tampão fosfato pH 7,4. Foi adicionado ao tampão um coquetel de inibidores de protease (aprotinina 1 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml e SBTI 1 mg/ml). Em seguida, o homogenato foi centrifugado (8.848×g / 5 min) a 4° C.

Após centrifugação, as proteínas do sobrenadante foram quantificadas utilizando o Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, E.U.A.), por ensaio colorimétrico em Leitor de Elisa (540 nm). As amostras foram desnaturadas (95°C, 5 min) em presença de β-mercaptoetanol. As proteínas foram separadas em gel de acrilamida e bisacrilamida (concentração de 12% para TH e actina) (SDS-PAGE). Utilizamos 10 µg de proteínas totais por *slot* do gel. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Hybond-P ECL membrane; Amersham Pharmacia Biotech, E.U.A.). Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas em T-TBS acrescido BSA (albumina de soro bovino) (5%, 25°C) sob agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína (quadro 2) (*overnight*, 5°C). Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com o 2º anticorpo conjugado à biotina por 1 h (25°C) sob agitação constante. Após mais uma sequência de lavagens, as membranas foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase, na mesma concentração do anticorpo secundário utilizado (1 h, 25°C). As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e tratadas por quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences, E.U.A.) com auxílio do aparelho Image Quant (LAS 500, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa *Image J* (Media Cybernetics, E.U.A.).

Quadro 2 – Anticorpos utilizados

	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
TH	anti-TH, mouse, 1:1.000 (Sigma)	anti-mouse, 1: 10.000 (Santa Cruz Biotechnology)
ACTINA	anti-actina, goat, 1:200 (Santa Cruz Biotechnology)	anti-goat, 1:5.000 (Santa Cruz Biotechnology)

3.9 Radioimunoensaio (RIE)

A corticosteronemia total foi avaliada utilizando o kit específico para murinos (ImmuChem™ 125I, duplo anticorpo, ICN Biomedicals, Inc, E.U.A.). O coeficiente de variação intra-ensaio foi 7%, sendo o limite mínimo de detecção de 50 ng/ml. Todas as amostras foram analisadas em um único ensaio em duplicatas.

3.10 Análise estatística

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. Todas as distribuições desse estudo foram paramétricas [valores de $P \geq 0,05$ (bi-caudal)] e as análises posteriores foram realizadas considerando-se esta característica. Os dados serão apresentados como médias \pm erros padrão das médias.

3.10.1 Consumo líquido e massa corporal

O consumo de líquidos durante o período de exposição foi analisado através de uma ANOVA. Os fatores utilizados foram IDADE, EXPOSIÇÃO e SEXO. O fator de repetição utilizado foi o DIA e as variáveis utilizadas foram o volume ingerido de solução diariamente corrigido pela massa corporal do animal (líquidos: ml/g).

A evolução da massa corporal dos animais durante o período de exposição (VIG) e dois períodos de retirada (RET5 e RET10) foi analisada através de uma análise de variância com medidas repetidas (ANOVA). Os fatores utilizados foram: IDADE (adolescentes e adultos), EXPOSIÇÃO (sacarina e nicotina), PERÍODO (vigência, 5 e 10 dias de abstinência) e SEXO (machos e fêmeas). O fator de repetição utilizado foi o DIA e a variável utilizada foi a massa corporal em gramas (g).

3.10.2 Parâmetros comportamentais

A análise dos comportamentos apresentados no LCE iniciou-se com análises de variância multivariada (ANOVA_m) em que os seguintes fatores foram utilizados: IDADE, EXPOSIÇÃO, PERÍODO e SEXO. Foram realizadas duas ANOVAs separadas, uma para as variáveis principais (Tempo BA, %Tempo BA, Entradas BA, %Entradas BA, %Tempo CN e Entradas FC) e uma para as variáveis etológicas (Elevação, Autolimpeza, Alongamento e Exploração com a cabeça).

Os comportamentos apresentados no CA foram analisados através de ANOVAs multivariadas onde os fatores analisados foram IDADE, EXPOSIÇÃO, PERÍODO e SEXO. Tal como para o LCE, foram realizadas duas ANOVAs separadas, uma para as variáveis principais e uma para as variáveis etológicas. As variáveis principais analisadas foram: Ambulação C, Ambulação B, Ambulação E, Ambulação Pe, Ambulação TOT, Tempo C, Tempo B, Tempo E, Tempo Pe. As variáveis etológicas analisadas foram: Elevação, Autolimpeza e Alongamento.

Análises *post hoc* foram realizadas com o teste de Fisher para comparações par a par (*Fisher protected least square difference test* no original em inglês). O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$. Para as interações entre fatores em que o valor de prova observado foi $P < 0,10$ (bi-caudal), os fatores interativos foram separados e as ANOVAs repetidas para verificar se os efeitos eram mantidos (Snedecor e Cochran, 1967).

3.10.3 Parâmetros endócrinos

O conteúdo de catecolaminas foi analisado através de uma análise de variância univariada (ANOVA_u). Os fatores utilizados foram IDADE, EXPOSIÇÃO, PERÍODO e SEXO, e a variável utilizada foi a concentração de catecolaminas em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido.

A concentração de corticosterona no soro foi analisada através de uma análise de variância univariada (ANOVA_u). Os fatores utilizados foram IDADE, EXPOSIÇÃO, PERÍODO e SEXO, e a variável utilizada foi a concentração de corticosterona em ng/ml .

O conteúdo de tirosina hidroxilase foi analisada através de uma análise de variância univariada (ANOVA_u). Os fatores utilizados foram IDADE, EXPOSIÇÃO, PERÍODO e

SEXO, e a variável utilizada foi o valor de unidades arbitrárias correspondente à quantificação das bandas realizada com o programa Image J.

4 RESULTADOS

4.1 Cotinina

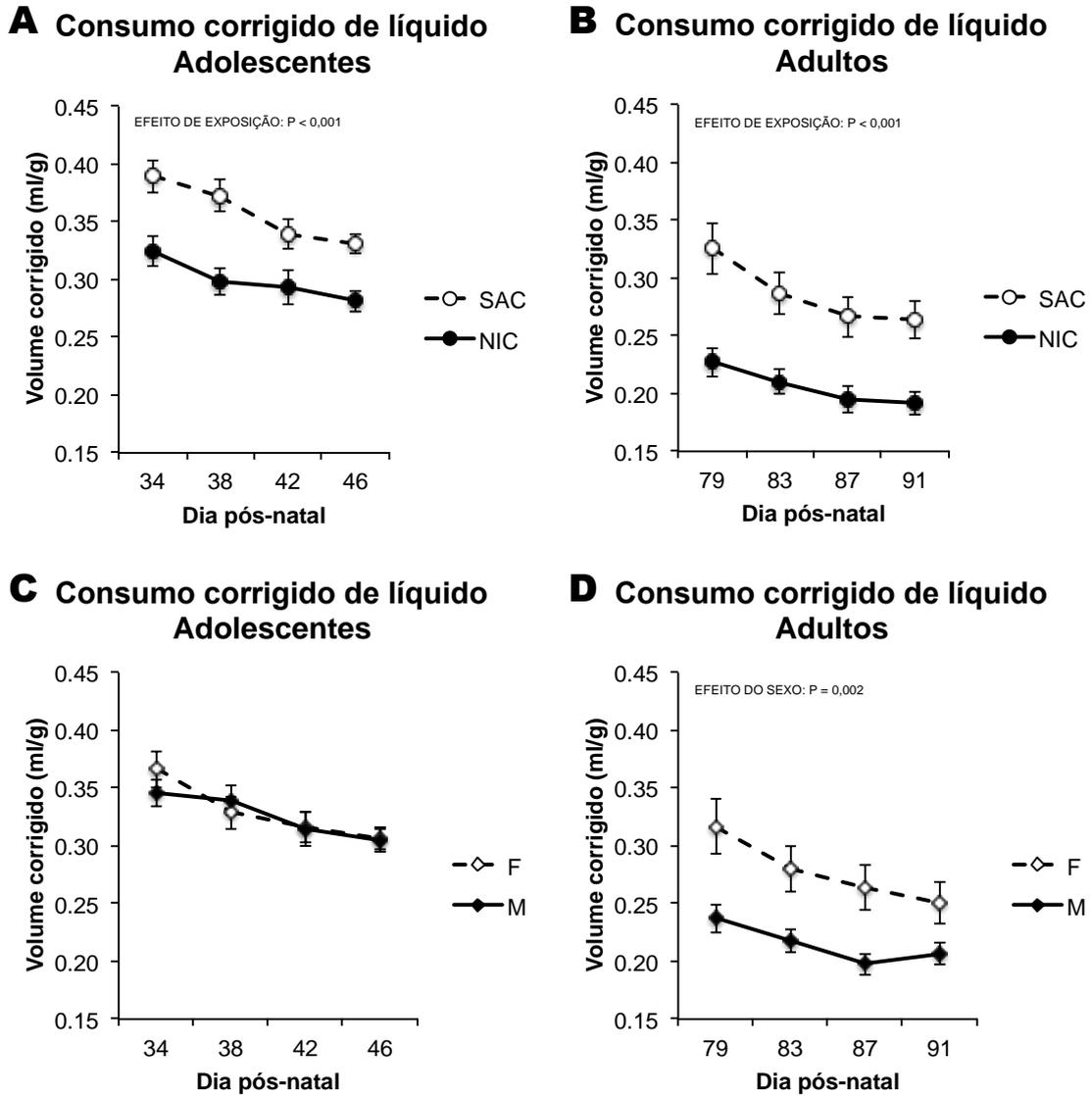
Nos camundongos que receberam nicotina, o nível sérico de cotinina foi de 243 ± 19 ng/ml. Não observamos diferenças significativas entre as idades estudadas, assim como não foram identificadas diferenças entre os sexos.

4.2 Consumo de líquidos

A avaliação da ingestão de líquidos corrigida pelo peso dos animais ao longo do período da exposição mostrou efeito do dia ($F = 22$; g.l. = 3; $P < 0,001$), indicando que ambos os grupos, tanto os animais expostos à sacarina quanto os animais expostos à nicotina, apresentaram redução no consumo de líquido ao longo deste período (figura 4). As análises par a par indicam que não houve redução significativa de consumo somente entre PN42 e PN46.

A ANOVA global também indicou efeitos significativos de Idade ($F = 57$; g.l. = 1; $P < 0,001$), de Exposição ($F = 39$; g.l. = 1; $P < 0,001$) e de Sexo ($F = 9,2$; g.l. = 1; $P = 0,003$). Com relação a idade, animais adolescentes ($0,33 \pm 0,007$ ml/g) apresentaram um consumo relativo de líquidos maior que os adultos ($0,24 \pm 0,011$ ml/g). Por sua vez, a exposição à nicotina reduziu o consumo relativo de líquido tanto na adolescência (figura 4A) quanto na vida adulta (figura 4B). Finalmente, enquanto nos adolescentes (figura 4C) não se verificou diferenças entre machos e fêmeas no consumo corrigido, nos adultos os machos consumiram menos líquido do que as fêmeas (figura 4D).

Figura 4 – Consumo de líquidos em adolescentes e adultos, segmentados por exposição ou sexo



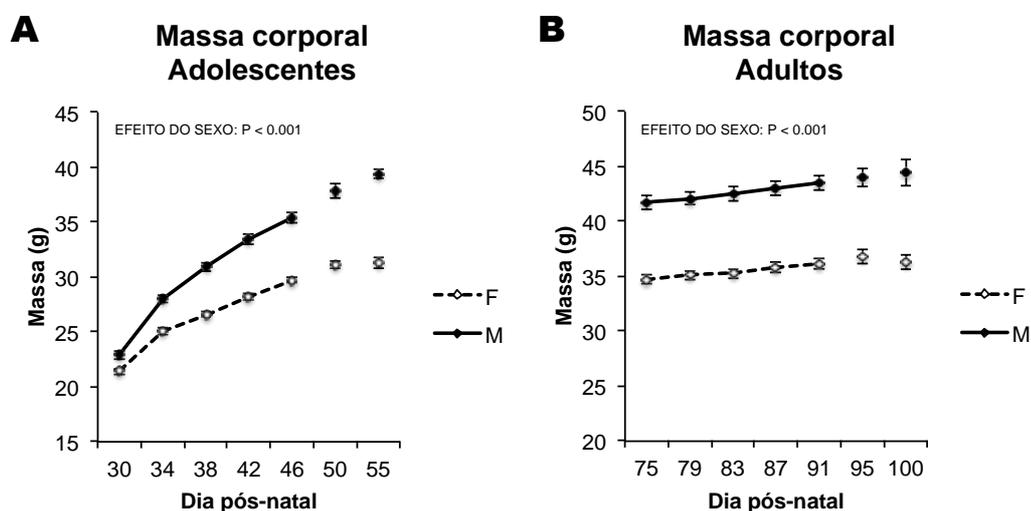
Legenda: Dados de consumo de líquidos durante o período de exposição em adolescentes (A e C) e adultos (B e D). Em A e B os dados são segmentados por grupo de exposição. Em C e D os dados são segmentados por sexo. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; F: fêmeas; M: machos. Valores são média \pm E.P.M.

Fonte: A autora, 2016.

4.3 Massa corporal

A avaliação da massa corporal dos animais ao longo do período da exposição mostrou um efeito do Dia ($F = 1063$; g.l. = 4; $P < 0,001$), indicando um crescimento de massa corporal, e uma interação Dia \times Idade ($F = 22$; g.l. = 3; $P < 0,001$), observação esta que é explicada pelo fato de que o crescimento de massa corporal é muito mais acentuado nos adolescentes do que nos adultos. Após a separação por idade, somente foram observados efeitos de Dia (ADOL: $F = 1765$; g.l. = 4; $P < 0,001$. ADULT: $F = 39$; g.l. = 4; $P < 0,001$) e Sexo (ADOL: $F = 66$; g.l. = 1; $P < 0,001$. ADULT: $F = 90$; g.l. = 4; $P < 0,001$) em ambas as idades e, somente nos adolescentes, uma interação Dia \times Idade ($F = 80$; g.l. = 4; $P < 0,001$), indicando que os machos apresentaram um ganho de massa corporal mais acentuado do que as fêmeas nesta faixa etária (figura 5). Tanto com 5 como com 10 dias de retirada somente foram observados efeitos de Sexo em ambas idades.

Figura 5 – Massa corporal em adolescentes e adultos, segmentados por sexo



Legenda: Dados de massa corporal durante o período de exposição, e após 5 e 10 dias de retirada em adolescentes (A) e adultos (B) segmentados por sexo. F: fêmeas; M: machos. Valores são média \pm E.P.M.

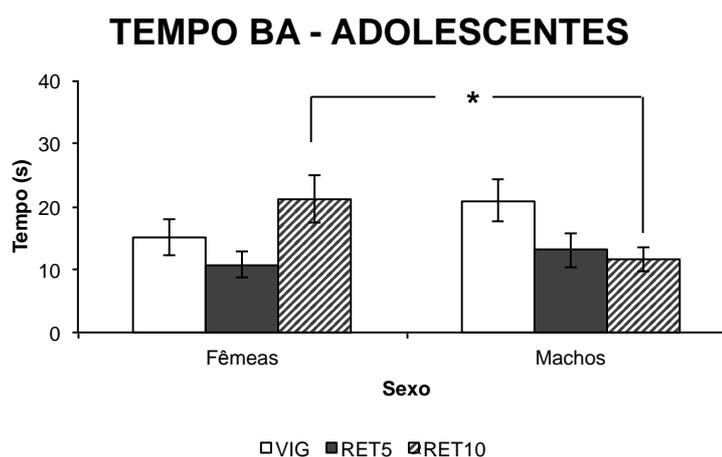
Fonte: A autora, 2016.

4.4 Análise comportamental

4.4.1 Labirinto em Cruz Elevado

Não foi observado efeito significativo da Exposição sobre as variáveis principais no LCE. Entretanto, foram observadas interações entre o Sexo e o Período para a variável Tempo BA ($F = 3,5$; g.l. = 2; $P = 0,031$). Durante a adolescência, em RET10, os machos permaneceram menos tempo no braço aberto quando comparados às fêmeas ($F = 5,2$; g.l. = 1; $P = 0,025$) (figura 6).

Figura 6 – Labirinto em Cruz Elevado: tempo no braço aberto



Legenda: Dados de tempo de permanência no braço aberto do LCE em adolescentes segmentados por sexo e período. VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

A ANOVA indicou um efeito significativo da Idade ($F = 10$; g.l. = 1; $P = 0,001$) e do Período ($F = 3,5$; g.l. = 2; $P = 0,033$) para a variável Entradas BA. Análises subsequentes, separadas por idade, mostraram efeito do Período ($F = 3,2$; g.l. = 2; $P = 0,043$) durante a adolescência. Observamos uma redução no número de Entradas BA em RET5 quando comparado à RET10 ($P = 0,012$) (figura 7A). Foram observados efeito significativo do Período ($F = 6,1$; g.l. = 2; $P = 0,002$), interação entre Idade e Período ($F = 2,4$; g.l. = 2; $P = 0,09$), e interação entre Exposição e Período ($F = 3,9$; g.l. = 2; $P = 0,02$) para a variável de %Entradas BA. Na adolescência, observamos efeito significativo do Período ($F = 6,5$; g.l. = 2; $P = 0,002$): em RET5 observamos redução no %Tempo BA quando comparado à VIG ($P =$

0,035) e RET10 ($P < 0,001$) (figura 7B). Não observamos diferenças significativas para ambas as variáveis durante a vida adulta.

Já para o %Tempo CN, observamos efeito significativo do Período ($F = 3,1$; g.l. = 2; $P = 0,047$) e interação entre Idade, Sexo e Período ($F = 3,6$; g.l. = 2; $P = 0,027$). Nossos dados mostraram que durante a adolescência, os machos testados durante a VIG apresentaram aumento do percentual de %Tempo CN comparados às fêmeas VIG ($F = 10$; g.l. = 1; $P = 0,002$) (figura 8). Não foi observado efeito significativo da Exposição sobre as variáveis %Tempo BA (figura 9A) e Entradas BF (figura 9B).

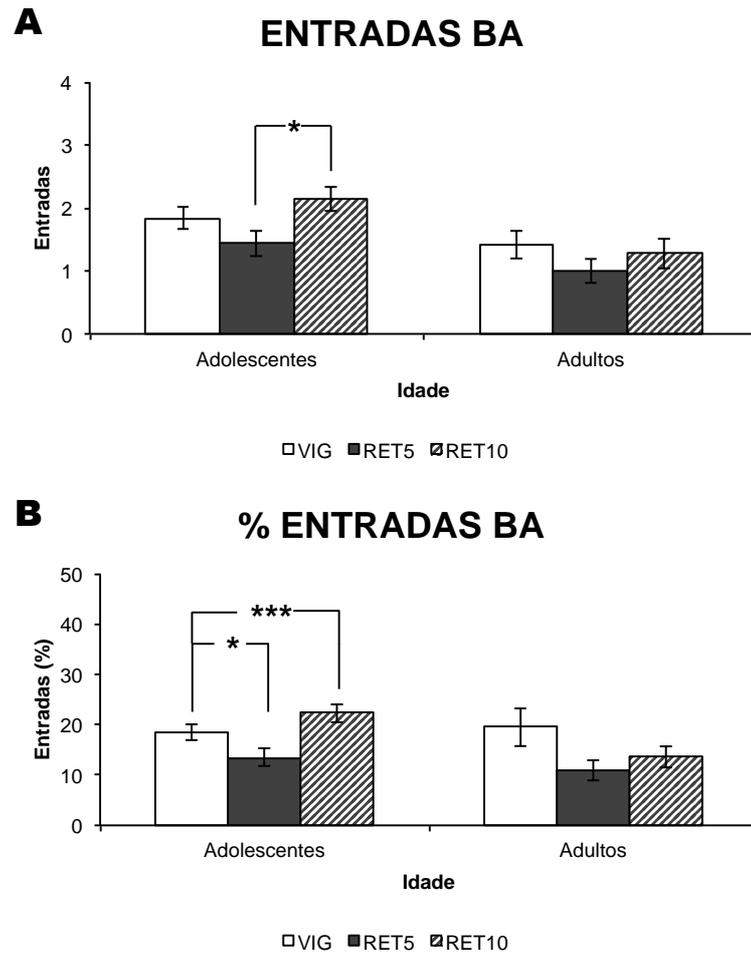
Também não foi observado efeito significativo da Exposição para a variável etológica Elevações. Entretanto, foi observado uma interação significativa entre Sexo e Período para esta variável ($F = 4,8$; g.l. = 2; $P = 0,010$). Para os animais adolescentes em RET10, observamos que os machos apresentaram aumento no número destes comportamentos ($F = 6,7$; g.l. = 1; $P = 0,013$) (figura 10).

Para a variável etológica Autolimpezas, observamos as seguintes interações significativas: Idade \times Exposição \times Sexo ($F = 7,6$; g.l. = 1; $P = 0,006$); Exposição \times Período \times Sexo ($F = 5,8$; g.l. = 2; $P = 0,003$). Na adolescência, o número foi menor nos machos NIC VIG ($F = 7,0$; g.l. = 1; $P = 0,015$) e nos machos NIC RET10 ($F = 5,5$; g.l. = 1; $P = 0,032$). Não foi observada diferença significativa para os animais adultos (tabela 2).

Foi observado efeito significativo da Idade ($F = 19,8$; g.l. = 1; $P < 0,001$), da Exposição ($F = 5,5$; g.l. = 1; $P = 0,020$) e do Período ($F = 8,4$; g.l. = 2; $P < 0,001$), e interação entre Idade e Sexo ($F = 3,5$; g.l. = 1; $P = 0,063$) sobre a variável Alongamentos. Animais adultos do grupo NIC apresentaram um aumento destes comportamentos quando comparados aos animais do grupo SAC ($F = 5,0$; g.l. = 1; $P = 0,027$) (figura 11A). Além disso, um efeito significativo do Período ($F = 6,0$; g.l. = 2; $P = 0,003$) foi observado: os grupos VIG ($P < 0,001$) e RET5 ($P = 0,019$) apresentaram um aumento no número de alongamentos comparados ao RET10 (figura 11B). Não foram observadas diferenças significativas para os animais durante a adolescência.

Observamos efeito significativo do Período ($F = 5,9$; g.l. = 2; $P = 0,003$) e uma interação Idade \times Período \times Sexo ($F = 3,0$; g.l. = 1; $P = 0,081$) para a variável Explorações com a cabeça no LCE. Os adolescentes machos NIC apresentaram um aumento no número de explorações quando comparados aos machos SAC ($F = 4,5$; g.l. = 1; $P = 0,037$) (figura 12A). Entretanto, para os animais adultos, foi observado um efeito significativo de Período ($F = 6,9$; g.l. = 2; $P = 0,002$): animais RET5 ($P < 0,001$) e RET10 ($P = 0,011$) apresentaram um número menor do que os VIG (figura 12C).

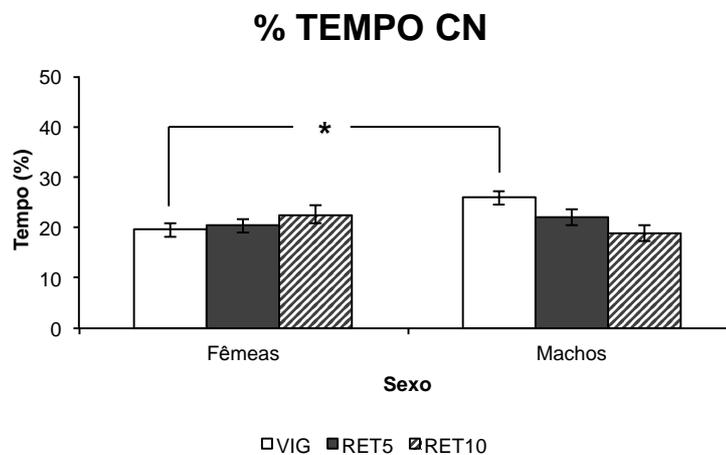
Figura 7 – Labirinto em Cruz Elevado: entradas e percentual de entradas no braço aberto



Legenda: Dados de entradas no braço aberto (A) e percentual de entradas no braço aberto (B) no LCE segmentados por idade e período. VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$; *** = $P \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

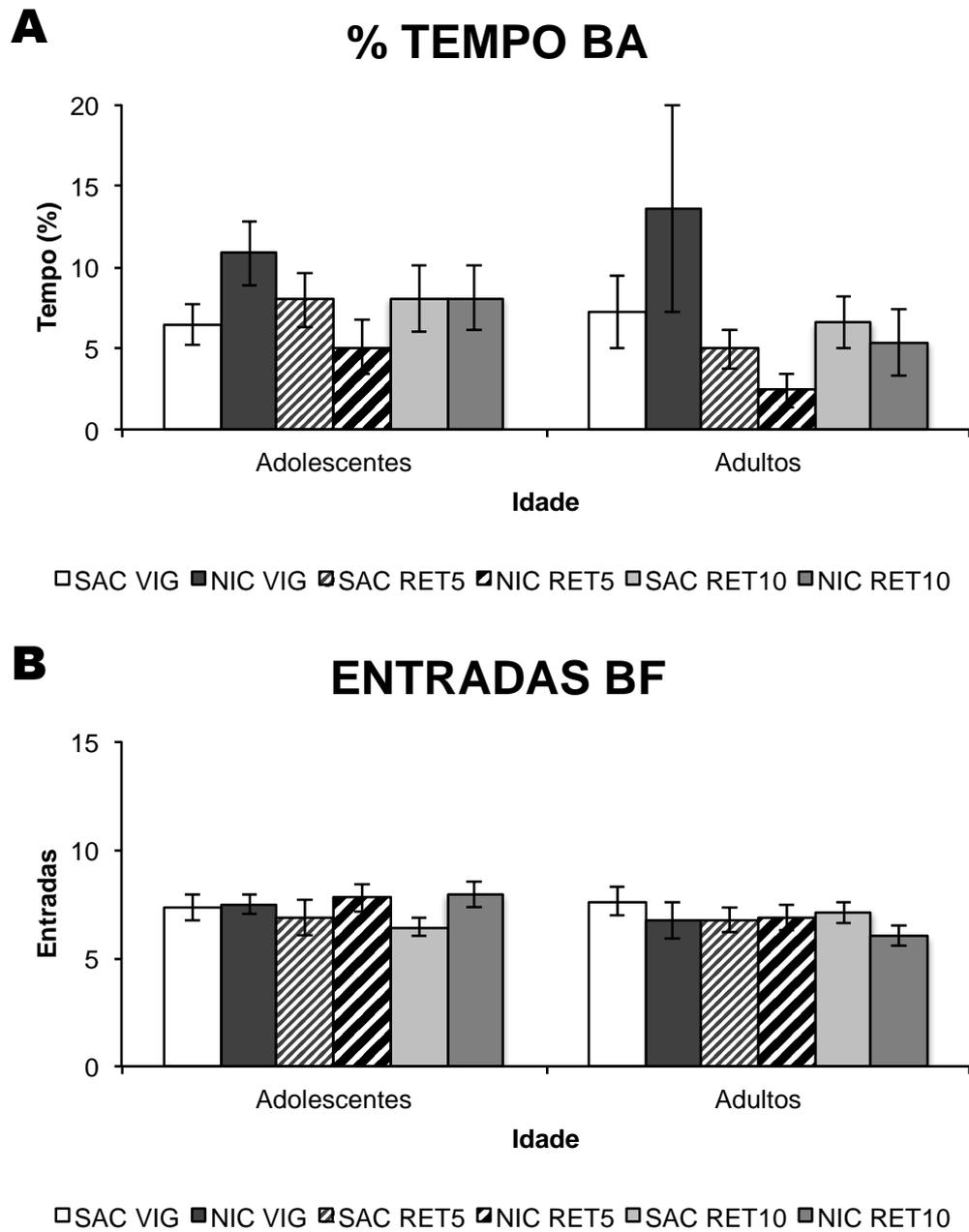
Figura 8 – Labirinto em Cruz Elevado: percentual de tempo no centro



Legenda: Dados de percentual de tempo no centro segmentados por sexo e período no LCE. F: fêmeas; M: machos; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

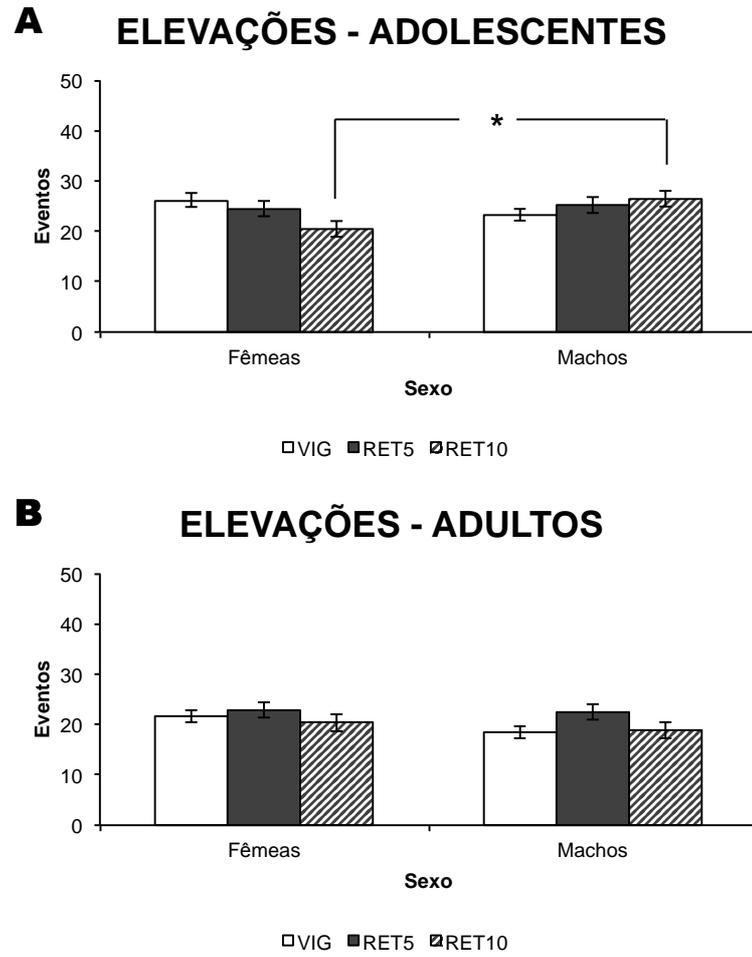
Figura 9 – Labirinto em Cruz Elevado: percentual de tempo no braço aberto e entradas no braço fechado



Legenda: Dados de percentual de tempo no braço aberto (A) e entradas no braço fechado (B) no LCE segmentados por idade, grupo e período. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média ± EPM.

Fonte: A autora, 2016.

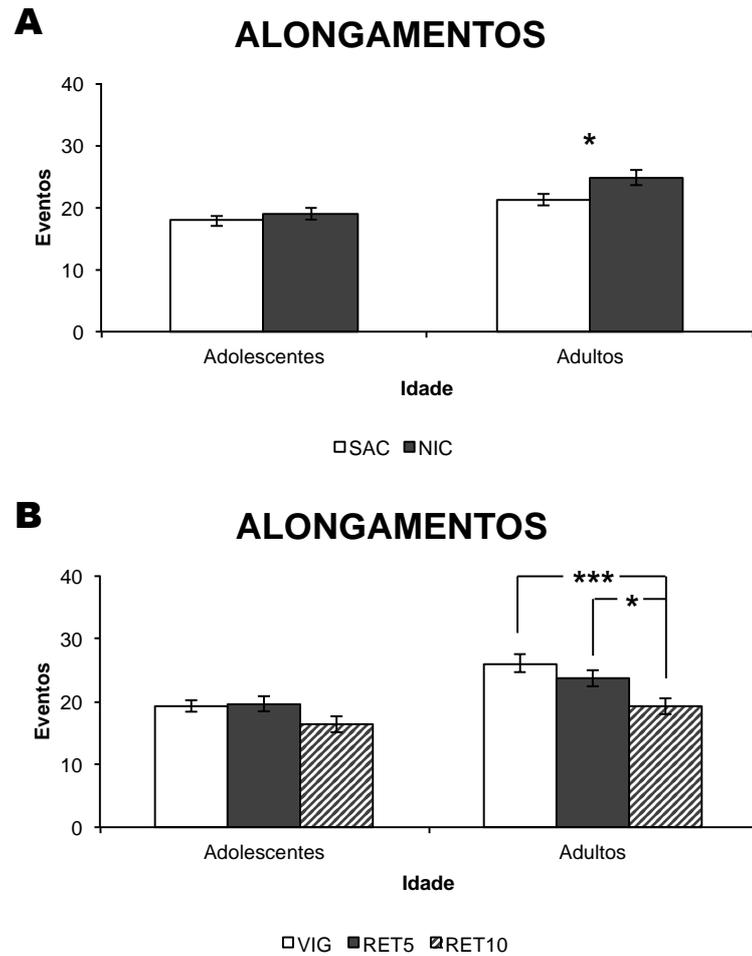
Figura 10 – Labirinto em Cruz Elevado: elevações



Legenda: Dados de elevações em adolescentes (A) e adultos (B) no LCE segmentados por sexo e período. F: fêmeas; M: machos; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

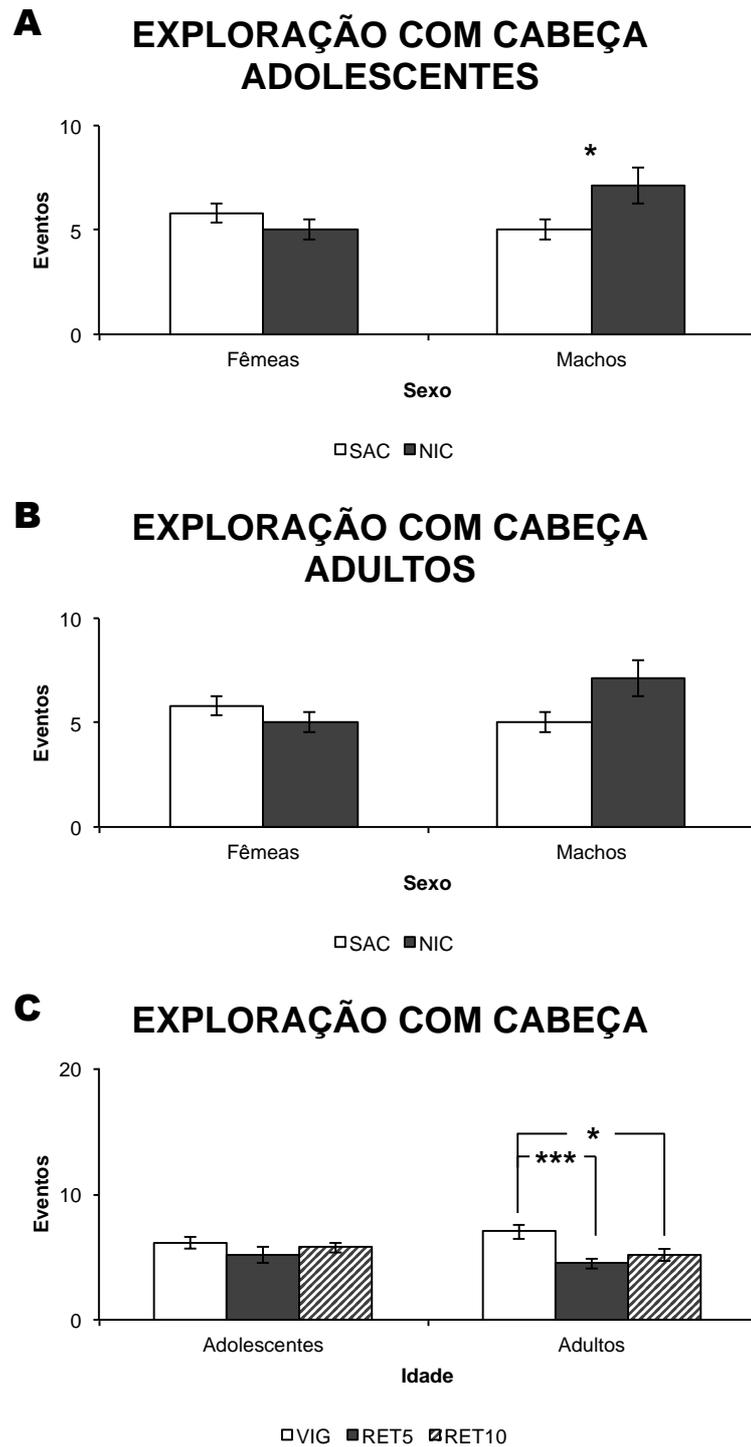
Figura 11 – Labirinto em Cruz Elevado: alongamentos



Legenda: Dados de alongamentos segmentados por idade e grupo (A) e dados de alongamentos segmentados em idade e período (B) no LCE. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$; *** = $P \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 12 – Labirinto em Cruz Elevado: mergulhos com a cabeça



Legenda: Dados de mergulhos de cabeça em adolescentes (A) e em adultos (B) segmentados por grupo e sexo. Dados de mergulhos de cabeça segmentados por idade e período (C) no LCE. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; F: fêmeas; M: machos; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$; *** = $P \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 2 – Resultados dos comportamentos etológicos no labirinto em cruz elevado

Teste	Avaliação	Grupo	Sexo	Adolescente			Adulto			
				VIG	RET5	RET10	VIG	RET5	RET10	
LCE	Elevação	SAC	Fêmea	27.7 ± 2.1	23.4 ± 2.0	18.9 ± 2.0	24.3 ± 2.1	23.5 ± 2.3	21.3 ± 3.6	
			Macho	25.1 ± 1.0	23.4 ± 2.4	27.9 ± 2.9	15.1 ± 2.5	22.1 ± 2.5	18.0 ± 1.9	
		NIC	Fêmea	24.7 ± 1.6	25.6 ± 2.3	22.0 ± 2.5	18.5 ± 3.8	22.3 ± 1.0	19.3 ± 1.9	
			Macho	21.5 ± 2.1	27.0 ± 2.0	25.2 ± 1.5	21.0 ± 1.7	23.0 ± 1.8	20.0 ± 3.6	
		Autolimpeza	SAC	Fêmea	3.4 ± 0.4	2.2 ± 0.4	2.6 ± 0.6	2.6 ± 0.4	4.0 ± 1.0	2.0 ± 0.3
				Macho	2.9 ± 0.5	3.2 ± 0.5	3.7 ± 0.8	1.7 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.6 ± 0.8
NIC	Fêmea	Fêmea	2.7 ± 0.4	2.3 ± 0.3	3.5 ± 0.5	1.5 ± 0.3	1.9 ± 0.5	3.3 ± 0.6		
		Macho	1.4 ± 0.3 *	2.8 ± 0.3	1.7 ± 0.2 *	2.3 ± 0.8	3.0 ± 0.6	2.1 ± 0.3		
Alongamento	SAC	Fêmea	Fêmea	17.5 ± 1.7	16.7 ± 1.9	15.2 ± 1.6	26.8 ± 2.1	20.6 ± 1.3	18.6 ± 2.2	
			Macho	20.9 ± 2.4	21.6 ± 2.0	14.9 ± 2.5	21.1 ± 1.9	22.6 ± 2.1	17.6 ± 2.7	
	NIC	Fêmea	Fêmea	18.3 ± 1.5	18.3 ± 2.2	19.0 ± 3.1	29.8 ± 2.7	25.1 ± 3.1	22.3 ± 3.2	
			Macho	20.5 ± 2.2	22.8 ± 3.4	15.8 ± 2.7	25.7 ± 3.5	25.9 ± 3.0	19.0 ± 1.8	
Exporação c/ cabeça	SAC	Fêmea	Fêmea	6.0 ± 0.9	5.0 ± 0.7	6.4 ± 0.5	7.8 ± 1.2	3.8 ± 0.5	6.1 ± 1.4	
			Macho	4.8 ± 0.4	5.4 ± 1.3	4.9 ± 0.8	6.7 ± 0.9	4.6 ± 1.0	6.1 ± 0.8	
	NIC	Fêmea	Fêmea	5.7 ± 0.9	3.9 ± 0.8	5.4 ± 0.9	6.0 ± 1.7	5.5 ± 0.5	4.4 ± 0.7	
			Macho	8.2 ± 1.3	6.5 ± 2.3	6.4 ± 1.0	7.4 ± 0.9	4.1 ± 0.9	3.6 ± 0.8	

Legenda: SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: animais avaliados durante a vigência; RET5: animais avaliados após uma retirada de 5 dias; RET10: animais avaliados após uma retirada de 10 dias. Valores são média ± EPM. * = $P < 0,05$ vs. SAC Macho.

Fonte: A autora, 2016.

4.4.2 Campo Aberto

Em relação as variáveis principais no CA, observamos interações significativas para a variável Ambulação total: Idade × Exposição × Sexo ($F = 4,1$; g.l. = 1; $P = 0,043$) e Exposição × Período × Sexo ($F = 2,3$; g.l. = 2; $P = 0,095$). Nossos resultados demonstraram que a exposição à nicotina durante a adolescência ($F = 4,9$; g.l. = 1; $P = 0,029$) aumentou a Ambulação total no CA (figura 13A). Para a variável de %Ambulação C foi observado um efeito do Período ($F = 7,6$; g.l. = 2; $P = 0,001$) e uma interação entre Período × Sexo ($F = 2,4$; g.l. = 2; $P = 0,090$). Independente da idade, foi observado, nos animais machos VIG, uma redução do % Ambulação C ($F = 4,7$; g.l. = 1; $P = 0,032$) (figura 13B), comparado com as fêmeas.

Observamos os seguintes efeitos e interações significativas para a variável Tempo C: Período ($F = 3,8$; g.l. = 2; $P = 0,023$), Exposição × Período ($F = 3,3$; g.l. = 2; $P = 0,038$), Idade × Exposição × Sexo ($F = 3,5$; g.l. = 1; $P = 0,060$) e Idade × Exposição × Período ($F = 2,6$; g.l. = 2; $P = 0,073$). Durante a adolescência, foi observado que o grupo NIC permaneceu mais tempo no centro comparado ao grupo SAC na RET5 ($F = 6,4$; g.l. = 1; $P = 0,016$) (figura 14A). Para os animais adultos, observamos interações significativas de Período × Sexo ($F = 3,4$; g.l. = 1; $P = 0,065$) e Exposição × Período ($F = 3,4$; g.l. = 2; $P = 0,036$). Em RET5, as

fêmeas NIC permaneceram mais tempo no centro em relação as fêmeas SAC ($F = 9,2$; g.l. = 21; $P = 0,009$) (figura 14C).

Quanto a variável Ambulação C, foi observado o seguinte efeito e interações significativas: Período ($F = 5,6$; g.l. = 2; $P = 0,004$), Idade \times Sexo ($F = 3,9$; g.l. = 1; $P = 0,050$) e Exposição \times Período ($F = 2,4$; g.l. = 2; $P = 0,088$). Nos animais adultos, observamos uma interação significativa Exposição \times Período ($F = 2,9$; g.l. = 2; $P = 0,056$). O grupo NIC teve um número menor de ambulações no centro comparados ao grupo SAC ($F = 6,5$; g.l. = 1; $P = 0,050$) em RET10 (figura 15A). Durante a adolescência foi observado um menor número de ambulações no centro em RET5 em relação à VIG ($P = 0,025$) e RET10 ($P = 0,030$) (figura 15B). Além disso, os machos apresentaram um menor número de ambulações no centro comparados às fêmeas ($F = 4,7$; g.l. = 1; $P = 0,032$) (figura 15C).

Para a variável Tempo E foi observado efeito significativo do Período ($F = 7,1$; g.l. = 2; $P = 0,001$) e interação significativa de Idade \times Exposição \times Período ($F = 3,5$; g.l. = 2; $P = 0,034$). Análises subsequentes mostraram que durante a adolescência foi observado um efeito significativo do Período ($F = 5,9$; g.l. = 2; $P = 0,003$) e uma interação entre Exposição e Período ($F = 4,8$; g.l. = 2; $P = 0,010$). Animais NIC VIG permaneceram mais tempo na esquina em relação aos animais SAC VIG ($F = 4,4$; g.l. = 1; $P = 0,040$) (figura 16A). Observamos efeitos distintos no períodos analisados nas diferentes idades. Durante a adolescência foi observado que os animais VIG permaneceu menos tempo na esquina em relação ao animais RET5 ($P = 0,002$) e RET10 ($P = 0,031$) (figura 16B). Para os adultos observamos aumento no tempo na esquina em RET5 comparados à VIG ($P = 0,042$) e à RET10 ($P = 0,029$) (figura 16B).

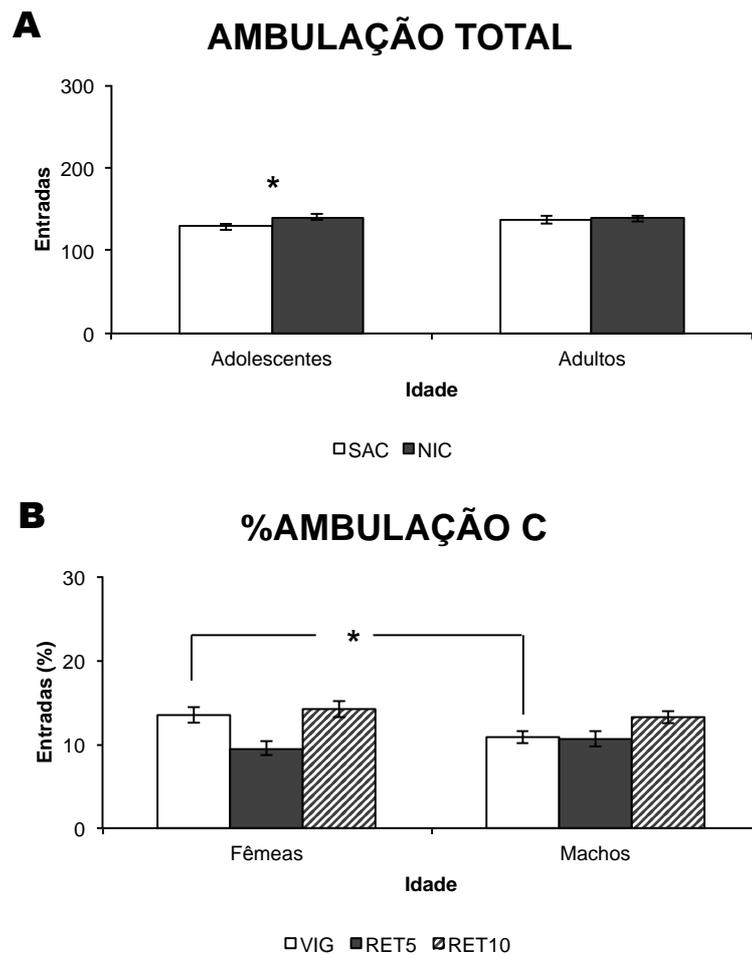
Foram observadas interações significativas entre Exposição, Período e Sexo para a Ambulação E ($F = 2,6$; g.l. = 2 ; $P = 0,075$). Análises subsequentes mostraram interação significativa da Exposição com o Sexo ($F = 5,0$; g.l. = 1; $P = 0,028$). Fêmeas NIC apresentaram maior número de Ambulação E em RET5 ($F = 6,5$; g.l. = 1; $P = 0,016$) (figura 16C). Não foram observados efeitos significativos no Tempo B (figura 17A) e Ambulação B (figura 17B) para ambas as idades estudadas.

Quanto as variáveis etológicas no CA, o único efeito significativo da Exposição foi observado no número de elevações, onde foi observado efeito significativo da Idade ($F = 4,6$; g.l. = 1; $P = 0,032$) e interação entre Exposição e Período ($F = 3,6$; g.l. = 2; $P = 0,028$). Durante a adolescência, o grupo NIC apresentou um aumento do número de elevações comparado ao grupo SAC ($F = 4,9$; g.l. = 1; $P = 0,028$) (figura 18).

Para a variável de Autolimpezas, foi observado um efeito significativo da Idade ($F = 7,9$; g.l. = 1; $P = 0,005$) e de Sexo ($F = 4,6$; g.l. = 1; $P = 0,031$), e uma interação entre Idade, Período e Sexo ($F = 4,9$; g.l. = 2; $P = 0,008$). Durante a adolescência foi observada uma redução no número de autolimpezas nos machos VIG comparados às fêmeas VIG ($F = 7,0$; g.l. = 1; $P = 0,011$) (figura 19A). Entretanto, nos adultos observamos uma redução no número de autolimpezas nos machos RET10 quando comparados com as fêmeas ($F = 6,1$; g.l. = 1; $P = 0,019$) (figura 19B).

Quanto a variável Alongamentos, foram observados os seguintes efeitos e interação significativas: Sexo ($F = 5,1$; g.l. = 1; $P = 0,024$), Período ($F = 6,1$; g.l. = 1; $P = 0,003$) e Idade \times Sexo ($F = 2,7$; g.l. = 1; $P = 0,099$). A análise subsequente mostrou que foi maior o número de alongamentos na VIG quando comparada à RET10 ($P = 0,009$) (figura 20).

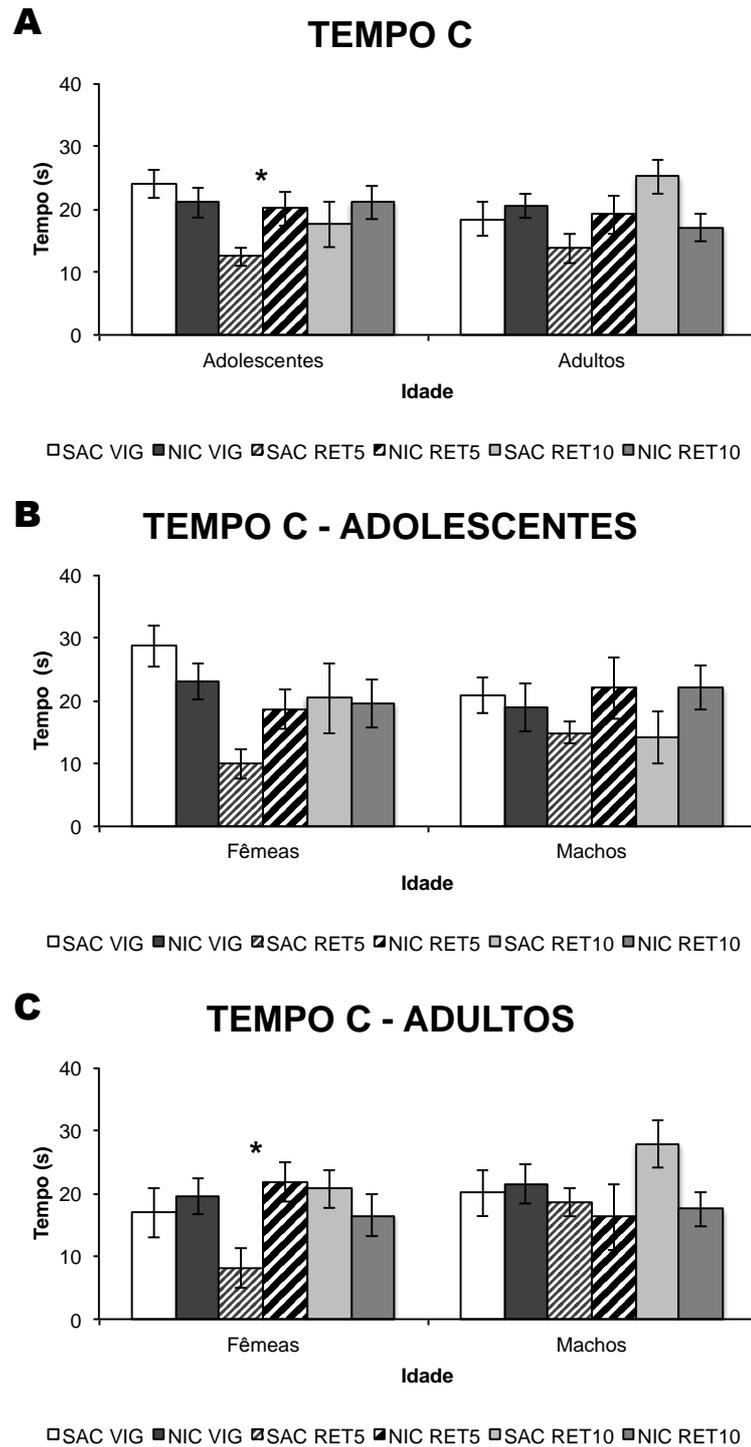
Figura 13 – Campo Aberto: ambulação total e percentual de ambulação no centro



Legenda: Dados de ambulação total segmentados em idade e grupo (A) e de percentual de ambulação no centro segmentados por sexo e período (B) no CA. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

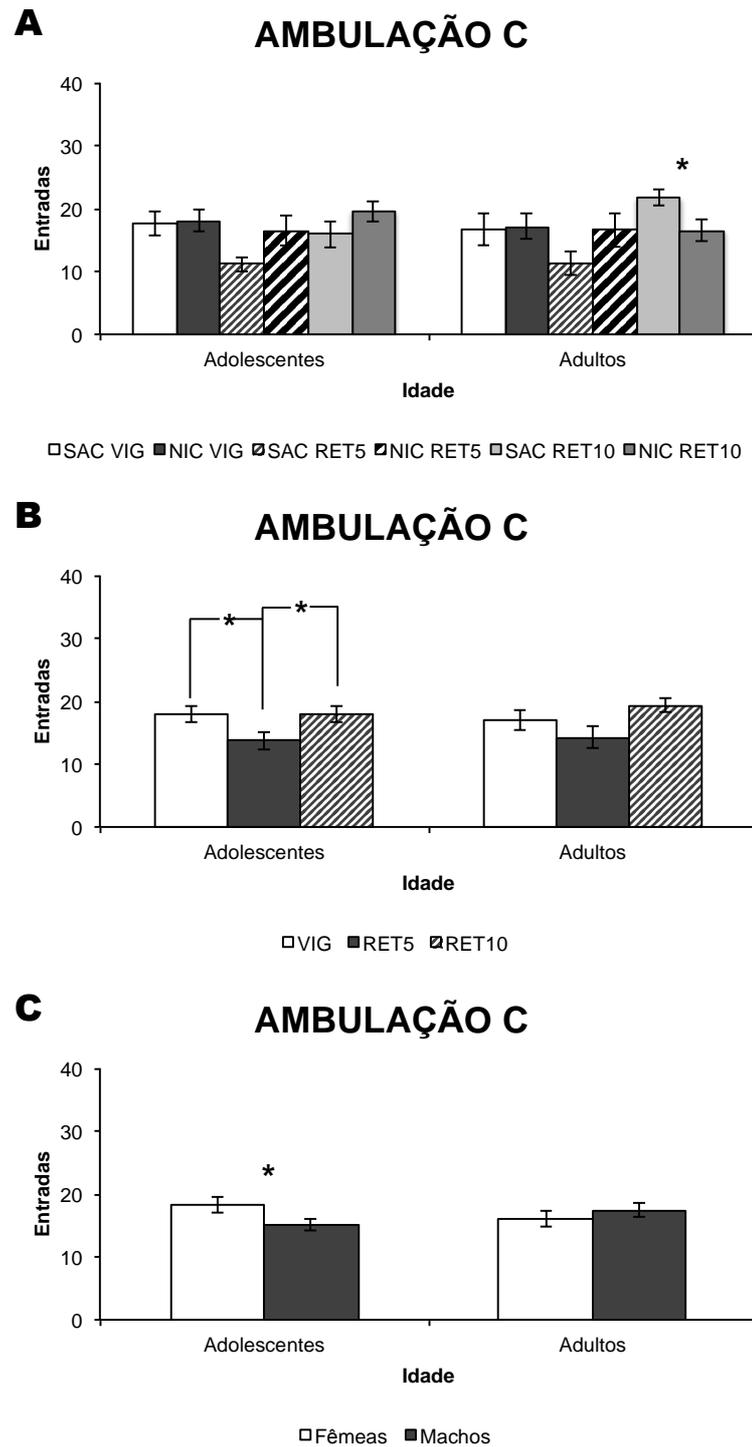
Figura 14 – Campo Aberto: tempo no centro



Legenda: Dados de tempo no centro segmentados por idade, grupo e período (A), dados de tempo no centro em adolescentes (B) e adultos (C) segmentados por sexo e período no CA. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; F: fêmeas; M: machos; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

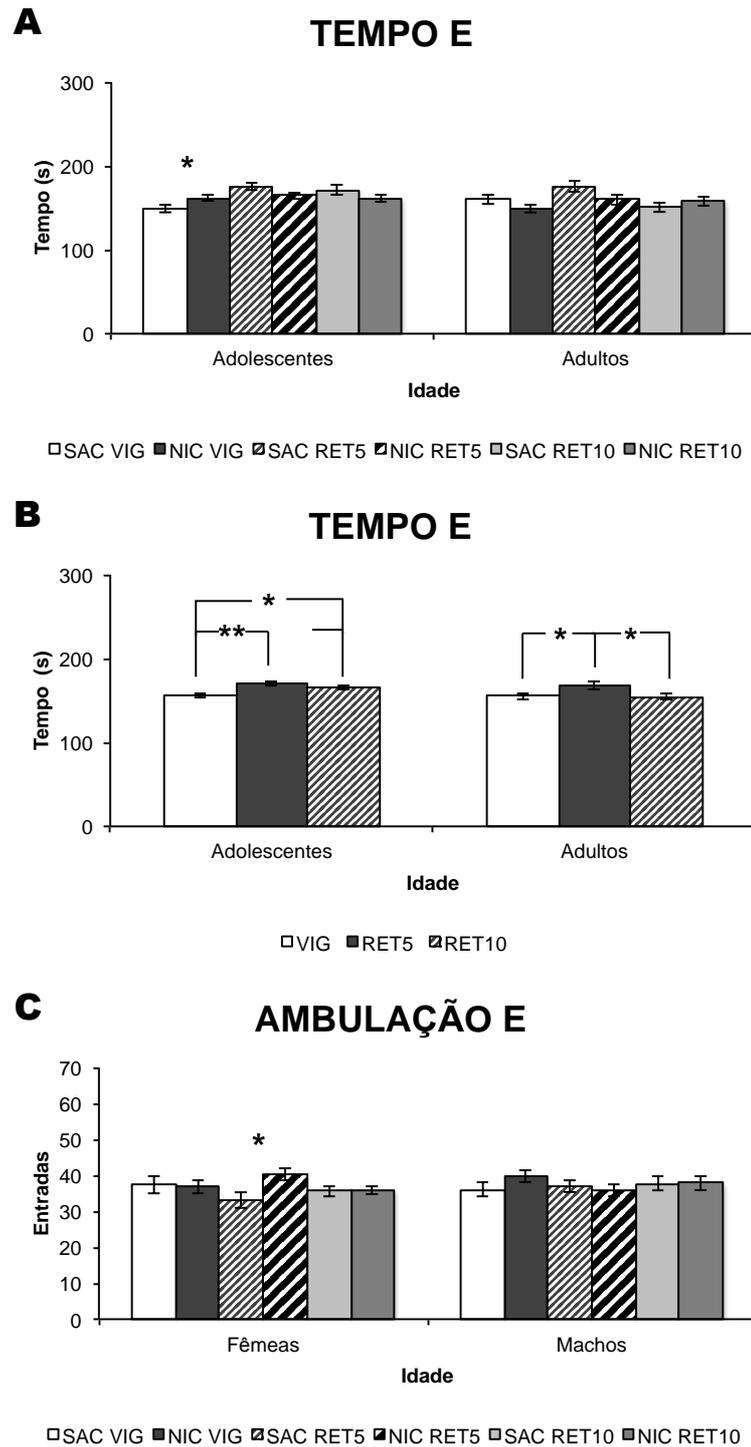
Figura 15 – Campo Aberto: ambulação no centro



Legenda: Dados de ambulação no centro segmentados por idade, grupo e período (A), ambulação no centro segmentados por idade e período (B) e ambulação no centro segmentados por idade e sexo (C) no CA. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; F: fêmeas; M: machos; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

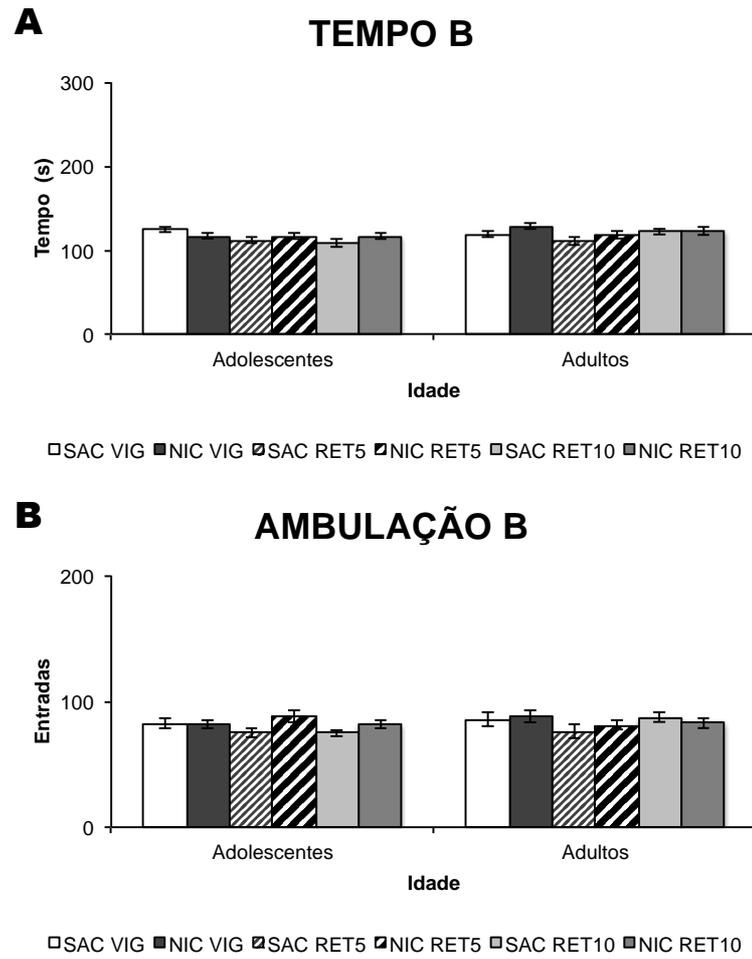
Figura 16 – Campo Aberto: tempo e ambulação na esquina



Legenda: Dados de tempo na esquina segmentados por idade, grupo e período (A), tempo na esquina segmentados por idade e período (B) e ambulação na esquina segmentados por sexo, grupo e período (C) no CA.. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; F: fêmeas; M: machos; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

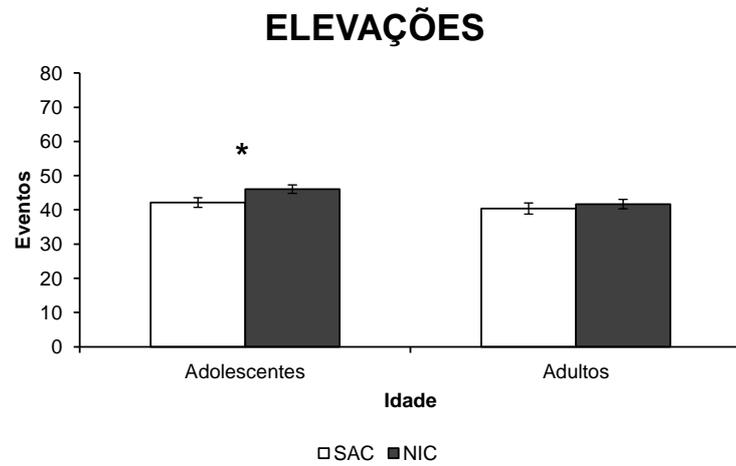
Fonte: A autora, 2016.

Figura 17 – Campo Aberto: tempo e ambulação na borda



Legenda: Dados de tempo na borda (A) e ambulação na borda (B) segmentados por idade, grupo e período no CA.SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM.
 Fonte: A autora, 2016.

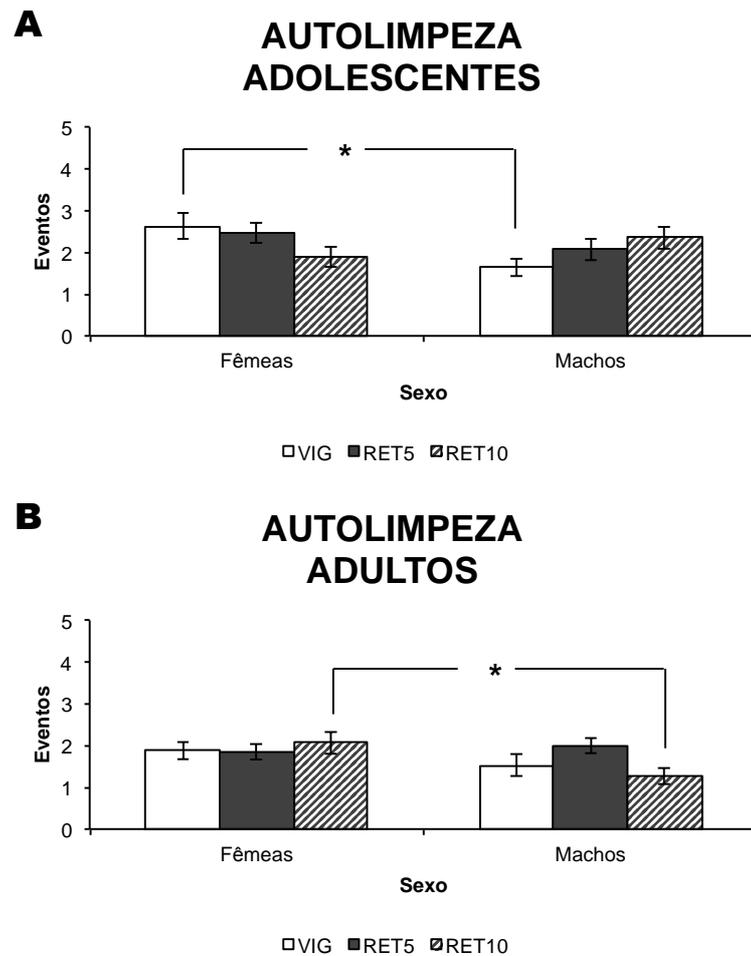
Figura 18 – Campo Aberto: elevações



Legenda: Dados de elevações segmentados por idade e grupo no CA. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina. Valores são média ± EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

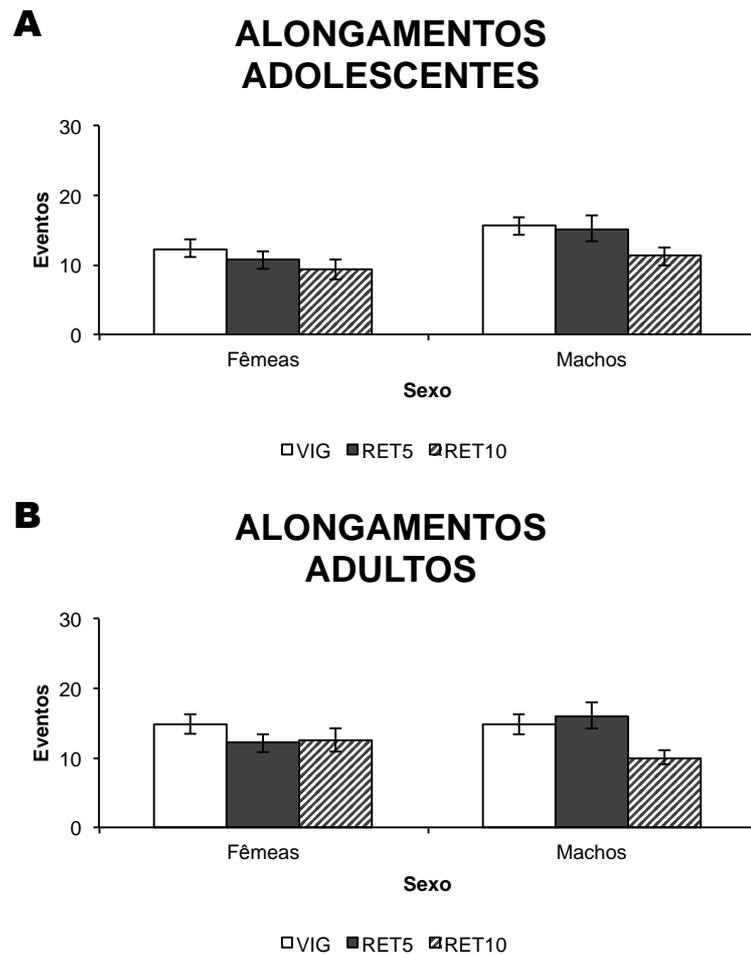
Figura 19 – Campo Aberto: autolimpeza



Legenda: Dados de autolimpezas nos adolescentes (A) e adultos (B) segmentados por sexo e período no CA. F: fêmeas; M: machos; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média ± EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 20 – Campo Aberto: alongamentos



Legenda: Dados de alongamentos nos adolescentes (A) e adultos (B) segmentados por sexo e período no CA. F: fêmeas; M: machos; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 3 – Resultados dos comportamentos etológicos no Campo Aberto

Teste	Avaliação	Grupo	Sexo	Adolescente			Adulto			
				VIG	RET5	RET10	VIG	RET5	RET10	
CA	Elevação	SAC	Fêmea	48.1 \pm 3.6	35.6 \pm 3.4	42.9 \pm 2.9	40.9 \pm 4.4	34.1 \pm 5.3	45.3 \pm 3.6	
			Macho	42.5 \pm 3.1	38.1 \pm 4.0	45.1 \pm 2.1	39.0 \pm 3.0	36.8 \pm 2.9	45.6 \pm 2.7	
		NIC	Fêmea	45.0 \pm 3.8	47.6 \pm 3.3	43.6 \pm 3.2	38.8 \pm 4.0	42.2 \pm 2.4	39.4 \pm 3.1	
			Macho	47.3 \pm 2.5	44.4 \pm 2.7	47.7 \pm 2.0	41.3 \pm 4.4	42.4 \pm 4.0	45.3 \pm 2.3	
		Autolimpeza	SAC	Fêmea	2.5 \pm 0.4	2.0 \pm 0.3	2.0 \pm 0.3	2.1 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2	2.6 \pm 0.4
				Macho	1.8 \pm 0.3	2.1 \pm 0.4	2.6 \pm 0.6	2.0 \pm 0.4	2.1 \pm 0.2	1.2 \pm 0.3
	NIC		Fêmea	2.7 \pm 0.5	3.0 \pm 0.3	1.7 \pm 0.4	1.6 \pm 0.3	1.7 \pm 0.3	1.6 \pm 0.2	
			Macho	1.5 \pm 0.3	2.0 \pm 0.3	2.2 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3	1.4 \pm 0.3	
	Alongamento		SAC	Fêmea	14.7 \pm 2.1	8.2 \pm 1.3	9.9 \pm 1.9	15.1 \pm 2.2	12.0 \pm 2.1	12.6 \pm 2.0
				Macho	16.2 \pm 2.1	15.9 \pm 3.1	14.6 \pm 2.3	15.1 \pm 2.0	16.6 \pm 3.1	9.3 \pm 1.3
		NIC	Fêmea	10.3 \pm 1.2	13.4 \pm 1.9	8.6 \pm 2.6	14.6 \pm 2.0	12.2 \pm 1.6	12.6 \pm 2.9	
			Macho	14.8 \pm 1.4	14.5 \pm 2.1	8.9 \pm 1.3	14.6 \pm 2.4	15.6 \pm 2.4	11.0 \pm 1.6	

Legenda: SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: animais avaliados durante a vigência; RET5: animais avaliados após uma retirada de 5 dias; RET10: animais avaliados após uma retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2016.

4.5 Análise endócrina

4.5.1 Conteúdo de catecolaminas

Animais testados

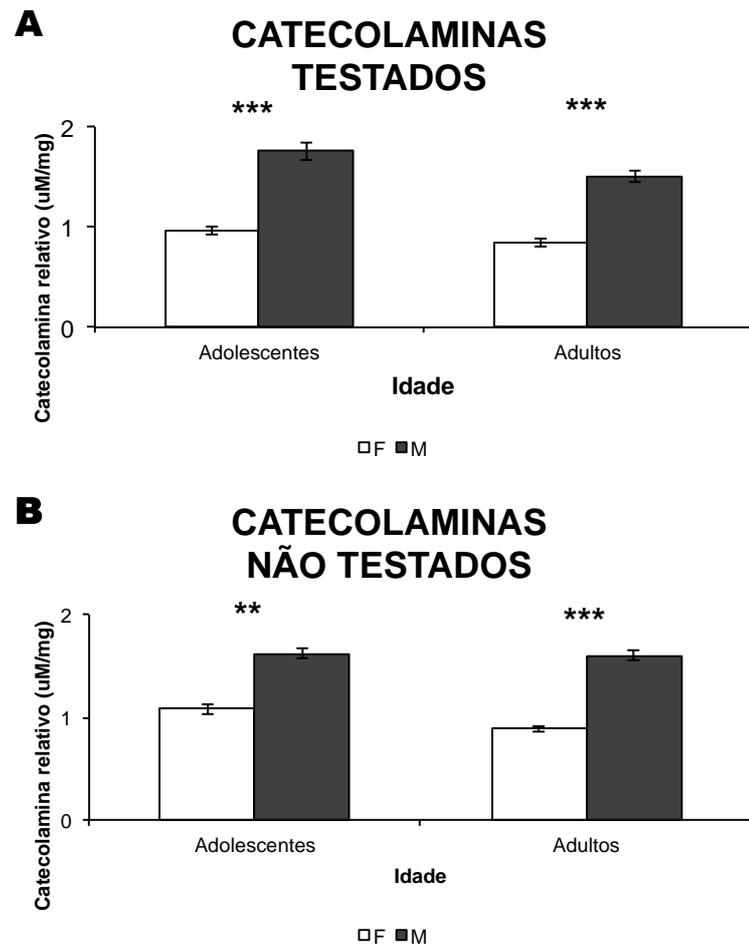
Não foram observados efeitos significativos da Exposição para o conteúdo de catecolaminas. Entretanto, a uANOVA mostrou os seguintes efeitos e interações significativos: Idade ($F = 8,6$; g.l. = 1; $P = 0,004$), de Sexo ($F = 133$; g.l. = 1; $P < 0,001$) e interação entre Idade \times Período \times Sexo ($F = 3,4$; g.l. = 2; $P = 0,034$), Idade \times Exposição \times Período ($F = 3,3$; g.l. = 2; $P = 0,036$) e Idade \times Exposição \times Período \times Sexo ($F = 3,0$; g.l. = 2; $P = 0,050$). Em ambas as idades estudadas, adolescentes ($F = 60$; g.l. = 1; $P < 0,001$) e adultos ($F = 75$; g.l. = 1; $P < 0,001$), observamos que os machos apresentaram maior conteúdo de catecolaminas quando comparados às fêmeas (figura 21A e tabela 4).

Animais não testados

Para os animais não submetidos aos testes comportamentais, foi observado um efeito significativo do Sexo ($F = 64$; g.l. = 1; $P < 0,001$) e interações entre Idade e Sexo ($F = 13$; g.l. = 1; $P < 0,001$), e entre Idade e Período ($F = 7,8$; g.l. = 2; $P = 0,001$). Assim como observado nos animais testados, nossos resultados demonstraram que, para os animais não submetidos aos testes comportamentais, os machos apresentaram maior conteúdo de catecolaminas durante adolescência ($F = 8,7$; g.l. = 1; $P = 0,004$) e vida adulta ($F = 83$; g.l. = 1; $P < 0,001$) (figura 21B e tabela 4).

Porém, observamos efeitos significativos da exposição à nicotina durante a vida adulta. O grupo NIC apresentou um maior conteúdo de catecolaminas do que o grupo SAC ($F = 4,5$; g.l. = 1; $P = 0,038$) (figura 22B). Além disso, foi observada uma interação significativa entre Exposição e Período ($F = 3,7$; g.l. = 2, $P = 0,028$): em RET10 o grupo NIC apresentou aumento do conteúdo de catecolaminas comparados ao grupo SAC ($F = 7,8$; g.l. = 1; $P = 0,01$) (figura 22A). Também foi observado que animais RET10 apresentaram maior conteúdo de catecolaminas comparados à VIG ($P = 0,006$) e RET5 ($P = 0,025$) (figura 23) nos adultos.

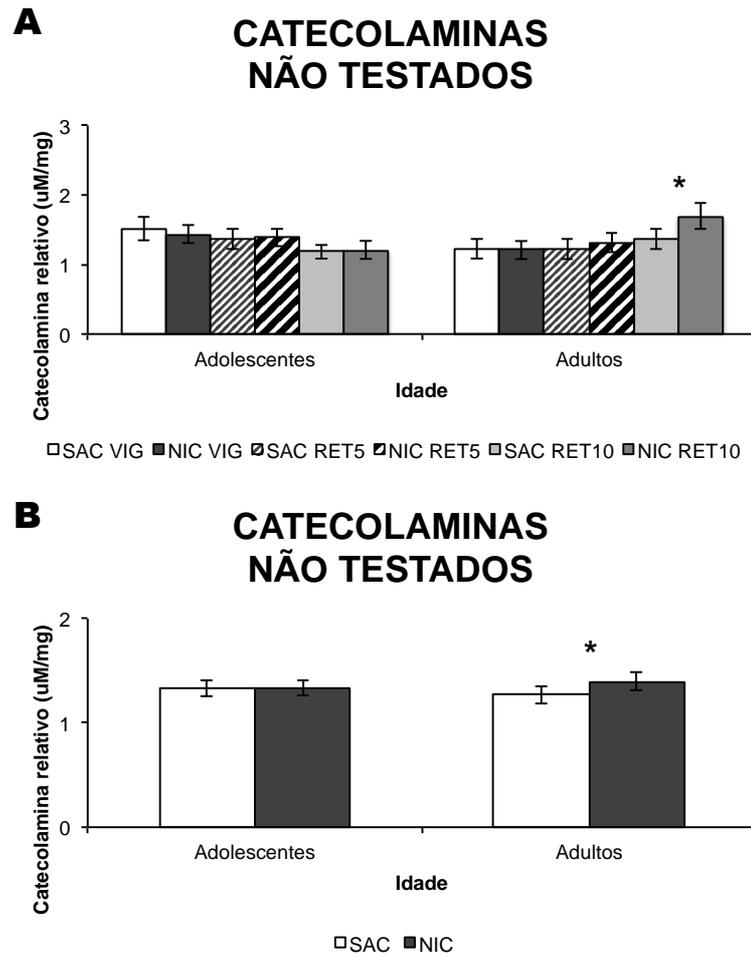
Figura 21 – Catecolaminas segmentadas por sexo



Legenda: Dados de conteúdo de catecolaminas nos animais testados (A) e nos animais não testados (B) segmentados por idade e sexo. : fêmeas; M: machos. Valores são média \pm EPM. ** = $P < 0,01$; *** = $P \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 22 – Catecolaminas segmentadas por exposição



Legenda: Dados de conteúdo de catecolaminas segmentados por idade, grupo e período (A) e conteúdo de catecolaminas segmentados por idade e grupo (B). SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 23 – Catecolaminas segmentadas por período



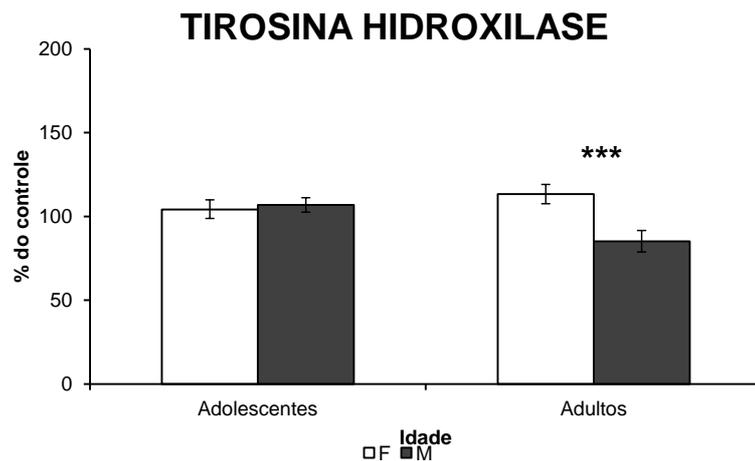
Legenda: Dados de conteúdo de catecolaminas nos adultos período SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

Fonte: A autora, 2016.

4.5.2 Expressão de Tirosina Hidroxilase (TH)

Para a análise do conteúdo de TH, foi observado um efeito significativo do Sexo ($F = 4,8$; g.l. = 1; $P = 0,030$) e interações entre Idade e Sexo ($F = 7$; g.l. = 1; $P = 0,009$), Sexo e Exposição ($F = 4,8$; g.l. = 1; $P = 0,030$) e Idade, Sexo e Exposição $F = 7$; g.l. = 1; $P = 0,009$). Nos adultos, observamos que os machos apresentaram menor conteúdo de TH em relação as fêmeas ($F = 11$; g.l. = 1; $P = 0,001$) (figura 24). Também para a vida adulta, observamos os machos NIC apresentaram menor conteúdo de TH quando comparados às fêmeas NIC ($F = 30$; g.l. = 1; $P < 0,000$) (figura 25B). Não foram observadas diferenças significativas em relação ao conteúdo de actina em ambas as idades estudadas.

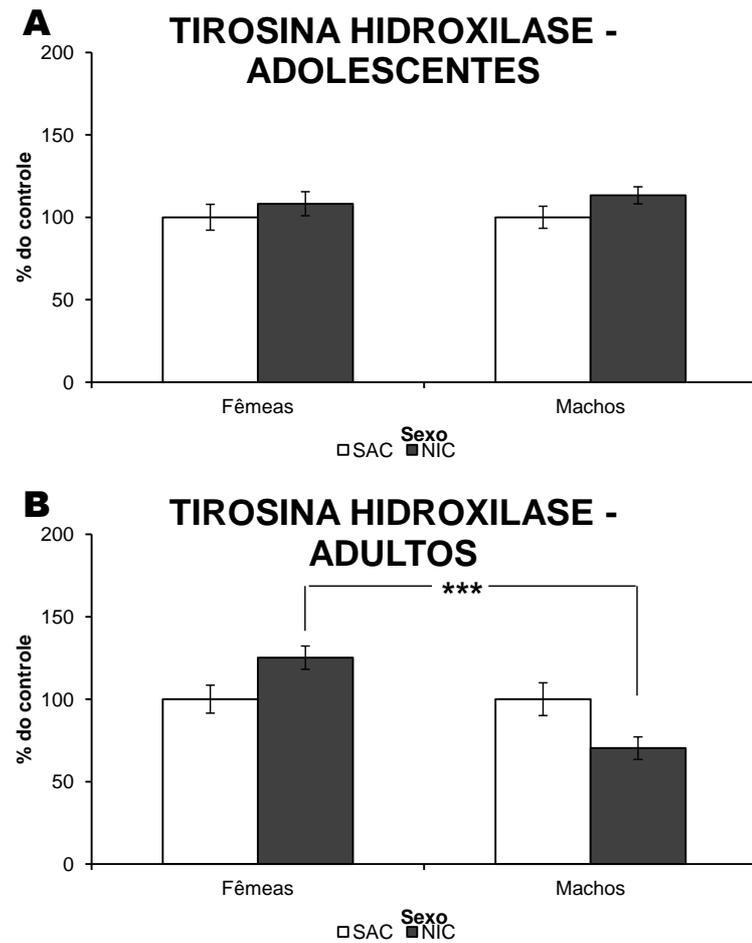
Figura 24 – Tirosina Hidroxilase segmentada por idade e sexo



Legenda: Dados do conteúdo de TH em adolescentes e adultos segmentados por sexo. F: fêmeas; M: machos. Valores são média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 25 – Tirosina Hidroxilase segmentada por idade, exposição e sexo



Legenda: Dados do conteúdo de TH em adolescentes (A) e adultos (B) segmentados por exposição e sexo. SAC: sacarina; NIC: nicotina; F: fêmeas; M: machos. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

4.5.3 Corticosterona

Animais testados

Para a dosagem de corticosterona nos animais testados, observamos efeitos significativos da Idade ($F = 6,3$; g.l. = 1; $P = 0,013$) e do Sexo ($F = 69$; g.l. = 1; $P < 0,001$), e as seguintes interações: entre Idade \times Exposição ($F = 4,4$; g.l. = 1; $P = 0,037$), Idade \times Período ($F = 2,5$; g.l. = 2; $P = 0,081$), Exposição \times Período ($F = 4,1$; g.l. = 2; $P = 0,017$) e Idade \times Exposição \times Período ($F = 2,3$; g.l. = 2; $P = 0,098$). Nos adultos, a corticosterona aumentou no grupo NIC ($F = 4,5$; g.l. = 1; $P = 0,035$) (figura 26). Em RET10, observamos que o grupo NIC apresentou aumento de corticosterona em comparação ao grupo SAC ($F = 12,6$; g.l. = 1; $P = 0,001$) (figura 27B). Também foi observado efeito do Sexo: machos apresentaram redução da dosagem de corticosterona em relação as fêmeas na adolescência ($F = 35$; g.l. = 1; $P < 0,001$) e na vida adulta. ($F = 33$; g.l. = 1; $P < 0,001$) (figura 28A e tabela 4).

Foram observadas interações significativas de: Exposição \times Período ($F = 5,1$; g.l. = 2; $P = 0,008$) e Sexo \times Exposição \times Período ($F = 2,4$; g.l. = 2; $P = 0,095$). As análises subsequentes mostraram que, para os animais adultos, os machos apresentaram menor corticosterona quando comparados às fêmeas para todos os períodos analisados: VIG ($F = 6,4$; g.l. = 1; $P = 0,019$), RET5 ($F = 21$; g.l. = 1; $P < 0,001$) e RET10 ($F = 13,0$; g.l. = 1; $P = 0,001$) (figura 29).

Animais não testados

Para os animais não testados, observamos efeitos significativos da Idade ($F = 12,9$; g.l. = 1; $P < 0,001$) e do Sexo ($F = 129$; g.l. = 1; $P < 0,001$), e interações entre Idade \times Sexo ($F = 5,4$; g.l. = 1; $P = 0,021$), Período \times Sexo ($F = 3,8$; g.l. = 2; $P = 0,023$), Exposição \times Período ($F = 5,3$; g.l. = 2; $P = 0,006$), Idade \times Exposição \times Sexo ($F = 4,5$; g.l. = 1; $P = 0,034$), Idade \times Exposição \times Período ($F = 3,8$; g.l. = 2; $P = 0,024$) e Idade \times x Exposição \times Período \times Sexo ($F = 5,3$; g.l. = 2; $P = 0,005$). Observamos efeitos da exposição à nicotina somente durante a vida adulta; fêmeas NIC apresentaram maior corticosterona comparadas às fêmeas SAC no RET10 ($F = 12,3$; g.l. = 1; $P = 0,006$). Também observamos que machos apresentaram redução de corticosterona em relação as fêmeas na adolescência ($F = 92$; g.l. = 1; $P < 0,001$) e na vida adulta ($F = 44$; g.l. = 1; $P < 0,001$) (figura 28B e tabela 4).

Foi observado também que os machos apresentaram menor corticosterona comparados às fêmeas para todos os períodos analisados: VIG (Adolescentes: $F = 40$; g.l. = 1; $P < 0,001$;

Adultos: $F = 4.3$; g.l. = 1; $P = 0,047$), RET5 (Adolescentes: $F = 41$; g.l. = 1; $P < 0,001$; Adultos: $F = 13.0$; g.l. = 1; $P = 0,002$) e RET10 (Adolescentes: $F = 15$; g.l. = 1; $P < 0,001$; Adultos: $F = 66$; g.l. = 1; $P < 0,001$) (figura 30).

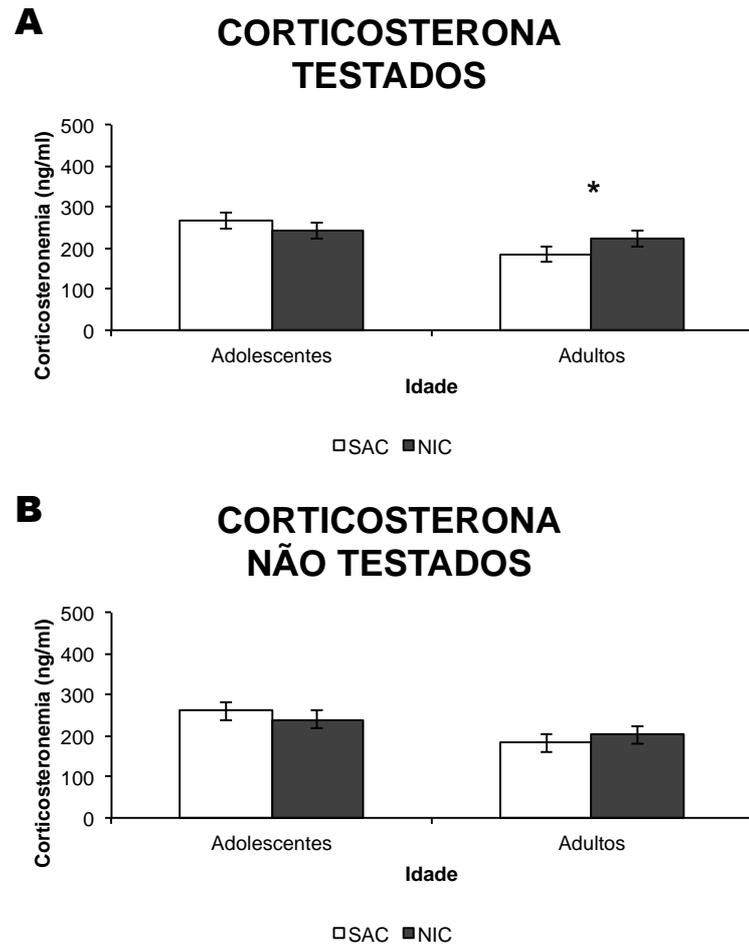
Tabela 4 – Resultados de catecolaminas e corticosterona

Avaliação	Teste	Grupo	Sexo	Adolescente			Adulto			
				VIG	RET5	RET10	VIG	RET5	RET10	
Catecolamina	Sim	SAC	Fêmea	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	
			Macho	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1	
		NIC	Fêmea	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2	
			Macho	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1	
		Não	SAC	Fêmea	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1
				Macho	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2
	NIC		Fêmea	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.2	
			Macho	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2	
	Corticosterona	Sim	SAC	Fêmea	334 ± 41	404 ± 17	324 ± 52	292 ± 75	277 ± 36	196 ± 39
				Macho	184 ± 38	194 ± 26	135 ± 20	110 ± 22	113 ± 16	108 ± 11
			NIC	Fêmea	354 ± 51	282 ± 52	259 ± 59	281 ± 73	205 ± 24	414 ± 79
				Macho	231 ± 40	165 ± 24	155 ± 33	170 ± 9	138 ± 15	193 ± 38
Não			SAC	Fêmea	369 ± 27	365 ± 47	464 ± 43	345 ± 63	209 ± 18	188 ± 28
				Macho	157 ± 33	128 ± 21	101 ± 10	181 ± 57	125 ± 23	67 ± 9
		NIC	Fêmea	276 ± 46	399 ± 74	329 ± 47	177 ± 37	275 ± 47	420 ± 43 **	
			Macho	175 ± 21	91 ± 17	189 ± 47	124 ± 29	141 ± 17	77 ± 17	

Legenda: SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: animais avaliados durante a vigência; RET5: animais avaliados após uma retirada de 5 dias; RET10: animais avaliados após uma retirada de 10 dias. Valores são média ± EPM. ** = $P < 0,01$ vs. SAC Fêmea.

Fonte: A autora, 2016.

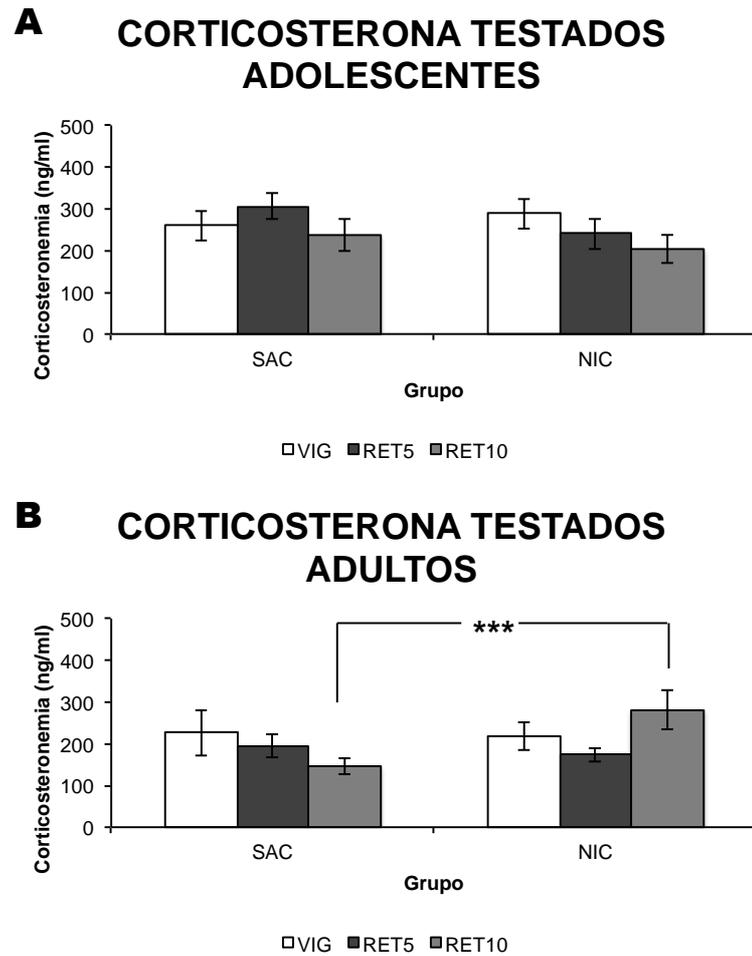
Figura 26 – Corticosterona segmentada por exposição



Legenda: Dados da dosagem de corticosterona nos animais testados (A) e nos animais não testados (B) segmentados por idade e grupo. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

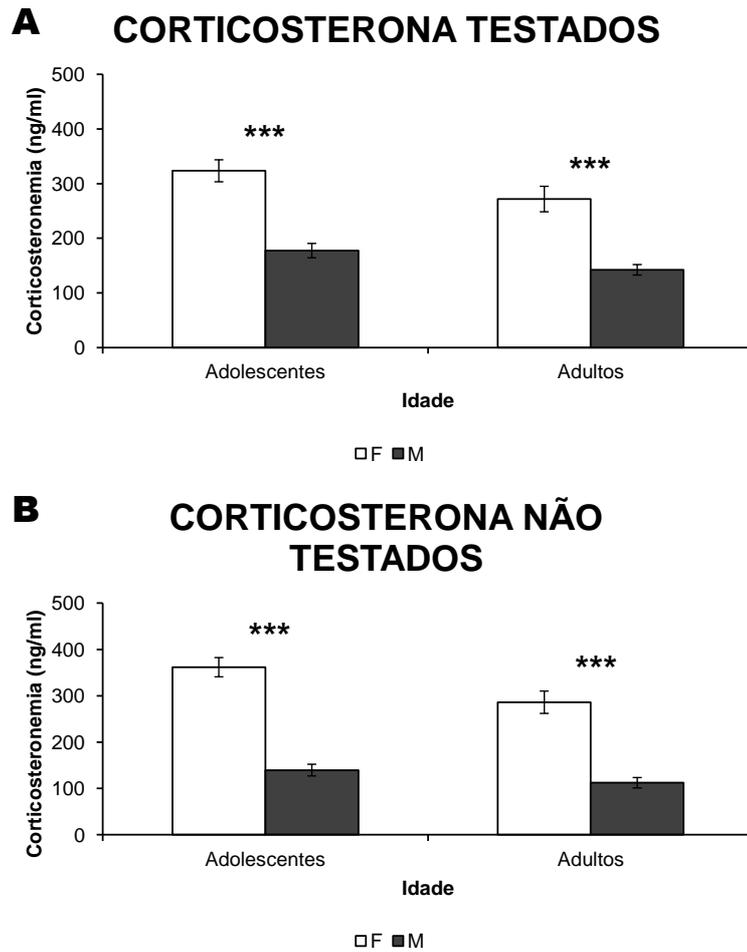
Figura 27 – Corticosterona segmentada por período



Legenda: Dados da dosagem de corticosterona nos adolescentes (A) e adultos (B) segmentados por grupo e período. SAC: animais expostos à sacarina; NIC: animais expostos à nicotina; VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. *** = $P \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

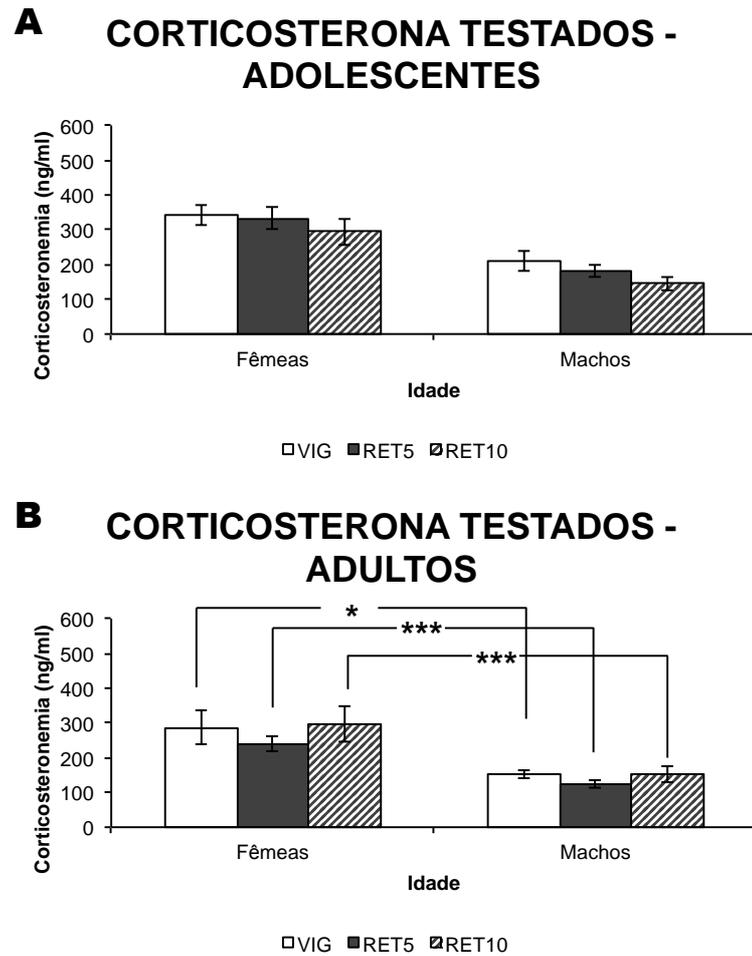
Figura 28 – Corticosterona segmentada por sexo



Legenda: Dosagem de corticosterona nos animais testados (A) e nos animais não testados (B) segmentados por idade e sexo. F: fêmeas; M: machos. Valores são média ± EPM. *** = $P \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

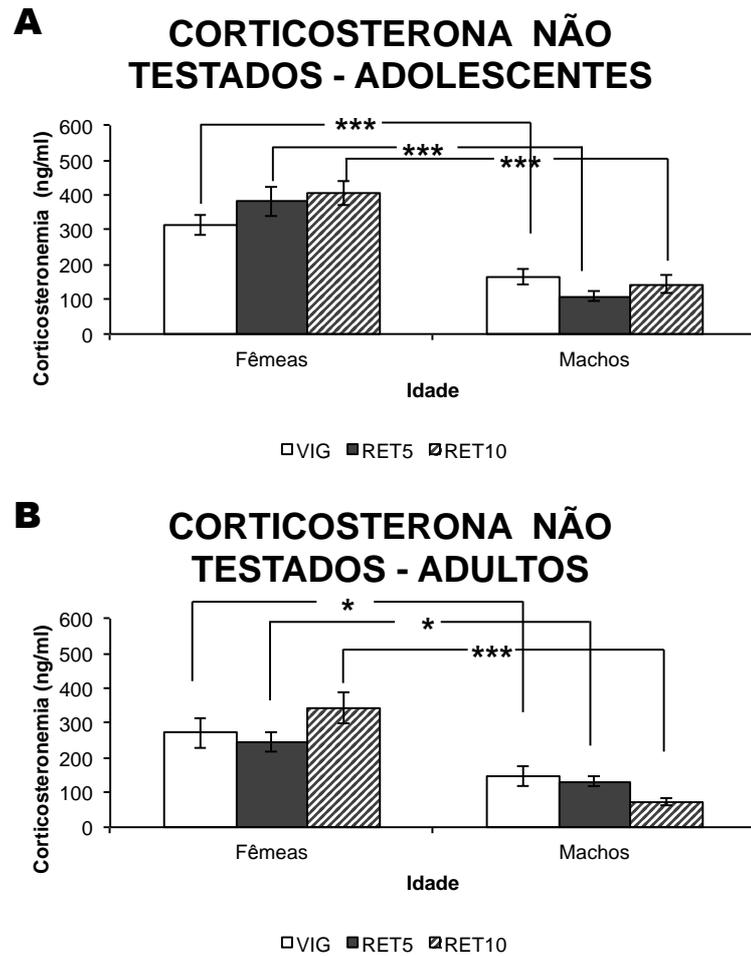
Figura 29 – Corticosterona segmentada por período



Legenda: Dados da dosagem de corticosterona de adolescentes (A) e adultos (B) segmentados por idade e período. VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$; *** = $P \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 30 – Corticosterona segmentada por período



Legenda: Dados da dosagem de corticosterona de adolescentes (A) e adultos (B) segmentados por idade e período. VIG: vigência; RET5: retirada de 5 dias; RET10: retirada de 10 dias. Valores são média \pm EPM. * = $P < 0,05$; *** = $P \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

5 DISCUSSÃO

5.1 Resumo dos resultados

Quadro 3 – Resultados segmentados por idade

Análise	Variável	Teste	Adolescentes	Adulto
<i>Dados Principais</i>				
Ansiedade	Tempo BA	LCE	=	=
	%Tempo BA	LCE	=	=
	Entradas BA	LCE	=	=
	% Entradas BA	LCE	=	=
	%Ambulação C	CA	=	=
	Tempo C	CA	=	=
	Ambulação C	CA	=	=
Atividade locomotora	Entradas BF	LCE	=	=
	Ambulação Total	CA	↑	=
Tomada de decisão	%Tempo CN	LCE	=	=
<i>Dados Complementares</i>				
Atividade locomotora	Tempo B	CA	=	=
	Ambulação B	CA	=	=
	Tempo E	CA	=	=
	Ambulação E	CA	=	=
Atividade vertical	Elevação	LCE	↑	=
		CA	=	=
Tomada de decisão	Autolimpeza	LCE	=	=
		CA	=	=
Avaliação de risco	Alongamento	LCE	=	↑
		CA	=	=
Atividade exploratória	Exploração c/ Cabeça	LCE	=	=
<i>Suprarrenal</i>				
	Catecolaminas	Sim	=	=
		Não	=	↑
	Tirosina Hidroxilase	Sim	=	=
		Não	=	↑
	Corticosterona	Sim	=	↑
		Não	=	=

Legenda: LCE: Labirinto em Cruz Elevado; CA: Campo Aberto.

Quadro 4 – Resultados segmentados por idade e sexo

Análise	Variável	Teste	Idade			
			Adolescentes		Adulto	
			Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
<i>Dados Principais</i>						
Ansiedade	Tempo BA	LCE	=	=	=	=
	%Tempo BA	LCE	=	=	=	=
	Entradas BA	LCE	=	=	=	=
	% Entradas BA	LCE	=	=	=	=
	%Ambulação C	CA	=	=	=	=
	Tempo C	CA	=	=	=	=
Atividade locomotora	Ambulação C	CA	=	=	=	=
	Entradas BF	LCE	=	=	=	=
Tomada de decisão	Ambulação Total	CA	=	=	=	=
	%Tempo CN		=	=	=	=
<i>Dados Complementares</i>						
Atividade locomotora	Tempo B	CA	=	=	=	=
	Ambulação B	CA	=	=	=	=
	Tempo E	CA	=	=	=	=
	Ambulação E	CA	=	=	=	=
Atividade vertical	Elevação	LCE	=	=	=	=
		CA	=	=	=	=
Tomada de decisão	Autolimpeza	LCE	=	=	=	=
		CA	=	=	=	=
Avaliação de risco	Alongamento	LCE	=	=	=	=
		CA	=	=	=	=
Atividade exploratória	Exploração c/ Cabeça	LCE	=	↑	=	=
<i>Suprarrenal</i>						
	Catecolaminas	Sim	=	=	=	=
		Não	=	=	=	=
	Tirosina Hidroxilase	Sim	=	=	=	=
		Não	=	=	=	=
	Corticosterona	Sim	=	=	=	=
		Não	=	=	=	=

Legenda: LCE: Labirinto em Cruz Elevado; CA: Campo Aberto.

Quadro 5 – Resultados segmentados por idade e período

Comportamento	Variável	Teste	EXPOSIÇÃO		RETIRADA DE 5 DIAS		RETIRADA DE 10 DIAS	
			Adolescentes	Adulto	Adolescentes	Adulto	Adolescentes	Adultos
<i>Dados Principais</i>								
Ansiedade	Tempo BA	LCE	=	=	=	=	=	=
	%Tempo BA	LCE	=	=	=	=	=	=
	Entradas BA	LCE	=	=	=	=	=	=
	% Entradas BA	LCE	=	=	=	=	=	=
	%Ambulação C	CA	=	=	=	=	=	=
	Tempo C	CA	=	=	↑	=	=	=
Atividade locomotora	Ambulação C	CA	=	=	=	=	=	↓
	Entradas BF	LCE	=	=	=	=	=	=
Tomada de decisão	Ambulação Total	CA	=	=	=	=	=	=
	%Tempo CN	LCE	=	=	=	=	=	=
<i>Dados Complementares</i>								
Atividade locomotora	Tempo B	CA	=	=	=	=	=	=
	Ambulação B	CA	=	=	=	=	=	=
	Tempo E	CA	↑	=	=	=	=	=
	Ambulação E	CA	=	=	=	=	=	=
Atividade vertical	Elevação	LCE	=	=	=	=	=	=
		CA	=	=	=	=	=	=
Ansiedade	Autolimpeza	LCE	=	=	=	=	=	=
		CA	=	=	=	=	=	=
Avaliação de risco	Alongamento	LCE	=	=	=	=	=	=
		CA	=	=	=	=	=	=
Atividade exploratória	Exploração c/ Cabeça	LCE	=	=	=	=	=	=
<i>Suprarrenal</i>								
	Catecolaminas	Sim	=	=	=	=	=	=
		Não	=	=	=	=	=	↑
	Tirosina Hidroxilase	Sim	=	=	=	=	=	=
		Não	=	=	=	=	=	↑
	Corticosterona	Sim	=	=	=	=	=	=
		Não	=	=	=	=	=	=

Legenda: LCE: Labirinto em Cruz Elevado; CA: Campo Aberto.

Quadro 6 – Resultados segmentados por idade, período e sexo

Comportamento	Variável	Teste	EXPOSIÇÃO		RETIRADA DE 5 DIAS		RETIRADA DE 10 DIAS	
			Adolescentes	Adulto	Adolescentes	Adulto	Adolescentes	Adulto
			Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
<i>Dados Principais</i>								
Ansiedade	Tempo BA	LCE	=	=	=	=	=	=
	%Tempo BA	LCE	=	=	=	=	=	=
	Entradas BA	LCE	=	=	=	=	=	=
	% Entradas BA	LCE	=	=	=	=	=	=
	%Ambulação C	CA	=	=	=	=	=	=
	Tempo C	CA	=	=	=	↑	=	=
Atividade locomotora	Ambulação C	CA	=	=	=	=	=	=
	Entradas BF	LCE	=	=	=	=	=	=
Tomada de decisão	Ambulação Total	CA	=	=	=	=	=	=
	%Tempo CN	LCE	=	=	=	=	=	=
<i>Dados Complementares</i>								
Atividade locomotora	Tempo B	CA	=	=	=	=	=	=
	Ambulação B	CA	=	=	=	=	=	=
	Tempo E	CA	=	=	=	=	=	=
	Ambulação E	CA	=	=	=	=	=	=
Atividade vertical	Elevação	LCE	=	=	=	=	=	=
		CA	=	=	=	=	=	=
Tomada de decisão	Autolimpeza	LCE	=	↓	=	=	=	↓
		CA	=	=	=	=	=	=
Avaliação de risco	Alongamento	LCE	=	=	=	=	=	=
		CA	=	=	=	=	=	=
Atividade exploratória	Exploração c/ Cabeça	LCE	=	=	=	=	=	=
<i>Suprarrenal</i>								
	Catecolaminas	Sim	=	=	=	=	=	=
		Não	=	=	=	=	=	=
	Tirosina Hidroxilase	Sim	=	=	=	=	=	↓
		Não	=	=	=	=	=	↑
	Corticosterona	Sim	=	=	=	=	=	=
		Não	=	=	=	=	=	↑

Legenda: LCE: Labirinto em Cruz Elevado; CA: Campo Aberto.

5.2 Níveis séricos de cotinina, consumo de líquidos e massa corporal

Os níveis séricos de cotinina encontrados nos animais corroboram um estudo prévio do nosso laboratório (Ribeiro-Carvalho et al., 2009) que mostrou que a concentração da solução de nicotina ingerida pelos camundongos gerou níveis de cotinina equivalentes, em humanos, à uma exposição entre moderada e alta.

O consumo de líquidos corrigido pelo peso dos animais variou durante todo o período de exposição, tanto nos animais que beberam sacarina quanto nos animais que beberam nicotina, onde foi observada diferença na ingestão de líquidos ao longo deste período. Em ambas as idades estudadas, nós observamos que durante o período de exposição o consumo de nicotina foi menor do que o de sacarina. Além disso, machos adultos apresentaram menor ingestão de líquidos do que as fêmeas adultas.

O modelo animal de administração de nicotina via oral tem sido amplamente utilizado e demonstrado ser capaz de gerar respostas comportamentais (Abreu-Villaça 2006; Adriani et al., 2004, 2002; Gaddnas et al., 2001), assim como alterações neuroquímicas (Ribeiro de Carvalho et al., 2008; Nuutinen et al., 2005; Sparks e Pauly, 1999). Entretanto, ratos e algumas cepas de camundongos demonstram aversão ao gosto da nicotina. No presente estudo, observamos que animais expostos à nicotina apresentaram menor ingestão de líquidos comparados aos expostos à sacarina. Desta forma, a redução no volume ingerido de nicotina pode ser explicado pelo fato da solução de nicotina ser pouco palatável, mesmo esta tendo sido dissolvida em uma solução de sacarina.

No presente estudo, a massa corporal dos animais tanto durante o período de exposição à nicotina quanto durante os diferentes períodos de retirada da droga (5 e 10 dias) não foi afetada. Em ambas idades e sexo estudados observamos aumento do padrão ao longo dos dias, porém o padrão de crescimento não foi afetado pela exposição à nicotina ou à sacarina assim como nos períodos de retirada da droga. Sabe-se que a nicotina é um agente anorexigênico (Arai et al., 2001), entretanto os animais do grupo exposto à nicotina não apresentaram perda de massa corporal ou padrão de crescimento menor. No geral, machos apresentam maior peso quando comparados as fêmeas.

5.3 Análise comportamental

5.3.1 Labirinto em cruz elevado

No teste do labirinto em cruz elevado, não observamos diferença significativa nas variáveis relacionadas à ansiedade, ou seja, no tempo, na porcentagem de tempo nos braços abertos, no número de entradas e na porcentagem de entradas nos braços abertos. Os efeitos da nicotina tem sido descritos como ansiogênicos ou ansiolíticos (Marco et al., 2006; Adriani et al., 2004; Elliot et al., 2004; Slawecki et al., 2003; Cheeta et al., 2001; Ouagazzal et al., 1999; Brioni et al., 1993). Em um estudo em ratos foi demonstrado que a nicotina durante adolescência não altera os níveis de ansiedade (Macro et al., 2006). Adicionalmente, em um estudo realizado pelo nosso grupo, Abreu-Villaça e cols (2008) mostraram através da exposição à nicotina na água de beber durante a adolescência, uma tendência de aumento da ansiedade devido a exposição à nicotina em camundongos, entretanto esta não foi significativa. Nossos resultados corroboram estes estudos, sugerindo que a exposição à nicotina e os períodos de retirada da droga não afetaram à ansiedade em ambas as idades estudadas.

Entretanto nossos resultados mostraram efeito de período e sexo apenas durante a adolescência. Observamos efeito do período para o número de entradas nos braços abertos, durante o período de 5 dias de retirada, os animais apresentaram menor número de entradas nos braços abertos do que aos 10 dias. Além disso, o percentual de entradas nos braços abertos também foi afetado, aos 5 dias de retirada onde o percentual de entradas foi menor comparado a vigência e aos 10 dias. Durante o período de 10 dias de retirada, as fêmeas permaneceram mais tempo nos braços abertos e apresentaram maior percentual de tempo no centro do equipamento durante o período da vigência. Durante a exposição, as fêmeas apresentaram menor percentual de tempo no centro do LCE.

Roedores adolescentes apresentam características comportamentais que os diferem de indivíduos mais novos e adultos. Em humanos, a adolescência também é caracterizada pelo aumento da ansiedade (Brooks e Atille 1996), da mesma forma, camundongos adolescentes jovens (4 semanas de vida) também apresentam aumento da ansiedade quando comparados aos mais jovens e aos adultos no teste claro/escuro (Larson e Richards 1994). Em um estudo realizado por Doremus e cols. (2003a) demonstraram que animais adolescentes são mais

ansiosos do que os animais adultos quando testados n LCE. Outros estudos relataram redução da ansiedade durante a adolescência, com os níveis de ansiedade sendo como crescentes através da idade em ratos (Imhof et al., 1993) e níveis de ansiedade mais baixos em camundongos durante a adolescência tardia quando comparados aos mais jovens e aos mais velhos (Macri et al., 2002).

Na literatura encontramos uma pequena discrepância do período considerado como adolescência em roedores, alguns autores definem como as primeiras alterações ocorrendo em PN20 e as últimas até PN55, outros definem a adolescência entre o período de PN21 até PN59 (Laviola et al., 2003; Tirelli et al., 2003). A adolescência ainda pode ser dividida em: precoce (PN24 a 35), média (PN37 a 48) e tardia (PN50 a 61) (Adriani et al., 2002a). Nossos resultados mostraram diferenças significativas entre os diferentes períodos estudados, onde observamos no período 5 dias de retirada (PN50) aumento da ansiedade através da redução no número e percentual de entradas nos braços abertos. Desta forma, as diferenças observadas no presente estudo podem estar relacionadas com os diferentes períodos da adolescência (precoce, média e tardia).

No presente estudo diferenças significativas entre as idades estudadas nas variáveis etológicas foram observadas. Logo, observamos diferenças nos comportamentos relacionados a avaliação de risco e tomada de decisão. Na vida adulta, os machos do grupo nicotina mostraram redução do número de autolimpeza durante a vigência e 10 dias de retirada da droga, sugerindo assim, que a tanto a exposição à nicotina como um período mais longo de retirada reduziram a tomada de decisão nesses animais. Além disso, adultos nicotina apresentaram aumento no número de alongamentos, sugerindo assim alteração na avaliação de risco. Efeito da idade e sexo foram observamos para o número de explorações com a cabeça, onde os adultos machos do grupo nicotina apresentaram aumento no número de explorações com a cabeça, desta forma sugerindo também alterações na avaliação de risco.

5.3.2 Campo Aberto

No campo aberto, observamos em ambas as idades analisadas, efeitos significativos da exposição à nicotina: durante o período da vigência, e o período de 5 e 10 dias de retirada da droga. Nossos resultados mostraram que adolescentes expostos à nicotina apresentaram aumento da atividade locomotora. É descrito na literatura que à nicotina possui efeitos

distintos em adolescentes e adultos. Estudos mostraram que ratos adultos expostos à nicotina apresentaram efeitos depressores na locomoção, enquanto que na adolescência a nicotina gera aumento da atividade locomotora (Belluzi et al. 2004; Elliott et al., 2004; Vastola et al., 2002). Além disso, estudos mostraram que camundongos são sensíveis aos efeitos de ativação locomotora da nicotina (Saito et al, 2005; Ulusu et al, 2005). Os resultados deste trabalho estão de acordo com os achados na literatura. Os animais expostos à nicotina durante a adolescência apresentaram aumento da atividade locomotora, sugerindo assim uma hiperatividade nos animais que receberam nicotina durante essa fase da vida. Entretanto a nicotina não afetou a locomoção nos animais adultos. Além disso, no período de 10 dias de retirada, os animais do grupo nicotina apresentaram redução no número de ambulações no centro do campo aberto na vida adulta. Estes dados sugerem um efeito depressor da retirada da nicotina nos adultos. Independente da idade, o período de retirada de 5 dias afetou o número de ambulações na esquina pois observamos que os machos nicotina apresentam redução no número de ambulações. Podemos concluir que os machos são mais sensíveis ao curto período de retirada da droga.

Os efeitos da nicotina no tempo na esquina foram restritos a adolescência. Durante o período da vigência o grupo nicotina permaneceu mais tempo na esquina. Em relação ao tempo no centro, o grupo nicotina apresentou aumento do tempo durante o período de 5 dias de retirada nos adolescentes. Entretanto, durante a vida adulta, esses efeitos foram dependentes do sexo. Para o mesmo período de retirada, de 5 dias, as fêmeas nicotina permaneceram mais tempo no centro. O LCE é classicamente utilizado como teste para investigar agentes ansiolíticos e ansiogênicos. Entretanto, o tempo no centro do campo aberto versus o tempo na borda do equipamento também podem ser utilizados como indicativo de aumento ou redução da ansiedade. Um dos sintomas mais mencionados por fumantes durante o período de retirada do tabaco é o aumento da ansiedade (Kassel e Unrod, 2000). Durante a adolescência, no período de 5 dias de retirada da droga, o grupo nicotina apresentou aumento do tempo no centro do CA. Sugerindo que os níveis de ansiedade não foram afetados durante um curto período de retirada. Também mostramos que para o mesmo período de retirada durante a vida adulta, as fêmeas nicotina permaneceram mais tempo no centro. Apesar de ser descrito aumento da ansiedade em adultos durante períodos de retirada, não observamos efeitos ansiogênicos da retirada da droga. No teste do campo aberto, o único efeito significativo da exposição à nicotina foi observado durante a adolescência, nós observamos aumento no número de elevações. Sugerindo que a nicotina aumentou a atividade vertical nesses animais.

5.4 Catecolamina, TH e Corticosterona

Nossos dados mostraram efeito do sexo para os conteúdos de catecolaminas totais na medula adrenal, onde em ambas as idades estudadas, o conteúdo de catecolaminas dos machos foi maior que os das fêmeas. Nos animais não submetidos aos testes comportamentais, observamos aumento do conteúdo de catecolaminas nos animais do grupo nicotina na adolescência e na vida adulta. Nos adultos, aos 10 dias de retirada, os conteúdos de catecolamina estavam aumentados nos animais do grupo nicotina. Também observamos efeitos significativos dos períodos nos adultos, aos 10 dias de retirada os conteúdos de catecolaminas estavam aumentados em relação ao período da vigência e aos 5 dias de retirada.

Tanto o córtex como a medula adrenal podem sofrer influência da nicotina. A medula adrenal possui receptores nicotínicos (Sala et al., 2008); a acetilcolina e seus agonistas, como a nicotina, se ligam aos receptores e estimulam a síntese e secreção de catecolaminas (Hiremagalaur et al., 1993; Slotkin e Seidler, 1975). A síntese de catecolaminas é regulada principalmente pela enzima tirosina hidroxilase (TH) (Haycock, 1990). Nossos dados foram restritos a vida adulta. Observamos aumento do conteúdo de catecolaminas nos animais expostos à nicotina, sugerindo maior sensibilidade dos adultos aos efeitos da nicotina. E mais, durante os 10 dias de retirada da droga, o grupo nicotina apresentou aumento do conteúdo de catecolaminas, mostrando que mesmo durante um período mais longo de retirada, é possível que esteja ocorrendo aumento de síntese ou diminuição da secreção.

A nicotina não aumenta somente a expressão de TH, mas também de outras enzimas envolvidas na biossíntese de catecolaminas, como por exemplo a FNMT, responsável pela conversão de noradrenalina em adrenalina. Já na análise da expressão da TH, o único efeito da exposição à nicotina foi observado nos animais adultos. Durante a vida adulta, os machos nicotina apresentaram menor conteúdo da enzima. Levando em conta que o conteúdo de catecolaminas do grupo nicotina adulto foi restrito ao período de 10 dias de retirada, provavelmente o aumento do conteúdo de catecolaminas não esteja relacionado com a expressão da TH, porém devido a alterações de outra enzima da via de biossíntese, como a FNMT, ou ao processo secretório. Quanto aos animais não testados, da mesma forma, o aumento do conteúdo de catecolaminas nos animais do grupo nicotina na vida adulta também podem estar relacionados a alterações de biossíntese e liberação.

Nossos dados também mostraram efeito do sexo em ambas as idades. Durante a vida adulta, os machos apresentaram aumento do conteúdo de catecolaminas. E também observamos que os machos adultos apresentaram diminuição da expressão da TH. Sabe-se que altas concentrações de catecolaminas inibem a atividade da TH. Com isso, podemos sugerir que a diminuição da expressão da TH nos animais machos adultos pode estar relacionado pela redução da atividade da enzima pelos altos níveis de catecolaminas. Durante a adolescência também observamos aumento do conteúdo de catecolaminas no machos, entretanto a redução da expressão da enzima TH foi restrito ao período da vigência nos machos, logo não podemos atribuir o aumento de catecolaminas a possíveis alterações na produção ou secreção hormonal.

No presente estudo, a nicotina afetou os níveis de corticosterona dependente da idade. Observou-se que os animais do grupo nicotina que foram submetidos aos testes comportamentais apresentaram maiores concentrações de corticosterona sérica em comparação ao grupo sacarina durante a vida adulta. Além do mais, aos 10 dias de retirada da droga, as concentrações de corticosterona permaneceram aumentados no grupo nicotina. Em relação aos animais que não foram submetidos aos testes comportamentais, observamos efeito da nicotina somente nas fêmeas, onde o grupo nicotina aos 10 dias de retirada apresentou aumento nos níveis de corticosterona durante a vida adulta. Em ambas as idades analisadas e independente de serem submetidos aos testes comportamentais, os machos apresentaram menores concentrações de corticosterona que as fêmeas.

Estudos em animais mostraram que a administração de nicotina eleva os níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona (Balfour et al., 1989; Andersson et al., 1981; Conte-Devolx et al. 1981; Cam et al. 1979). Diferenças nas respostas do eixo HPA à nicotina tem sido observado entre adolescentes e adultos (Cruz et al., 2008; Matta et al., 1987; McCormick and Ibrahim, 2007). Estudos demonstraram que a administração de nicotina aumenta a liberação de corticosterona em adultos (Matta et al., 1998; Cam e Bassett et al., 1983; Balfour et al., 1975). Além disso, machos adolescentes são menos sensíveis a ativação do eixo HPA pela nicotina quando comparados aos adultos (Cao et al., 2007a). Mostramos que animais expostos à nicotina durante a vida adulta apresentaram concentrações séricas elevadas de corticosterona, sugerindo assim que os adultos são mais sensíveis aos efeitos da nicotina corroborando com a literatura. Além do mais, aos 10 dias de retirada as concentrações de corticosterona permaneceram aumentadas no grupo nicotina, o que pode estar relacionado ao estresse causado pela retirada da nicotina assim como os efeitos do teste comportamental.

Afim de avaliar somente os efeitos da exposição à nicotina, animais não submetidos aos testes comportamentais foram utilizados neste estudo. Observamos que as fêmeas adultas apresentaram altas concentrações de corticosterona durante os 10 dias de retirada. Fêmeas adultas parecem mais sensíveis aos efeitos da nicotina no eixo HPA comparados aos machos (Rhodes et al., 2001). Estudo realizado por Hughes e cols. (1988) avaliou os efeitos da retirada do tabaco nos níveis de cortisol. Foi encontrado um aumento das concentrações de cortisol 48 h após a abstinência em relação as concentrações dos fumantes. Entre os sintomas de retirada da nicotina em indivíduos que tentam parar de fumar, alterações nos níveis de cortisol parece ser uma das respostas do corpo a retirada da droga (Hochberg et al., 2003). Desta forma, o aumento das concentrações de corticosterona pode estar relacionado ao aumento do estresse durante o período de retirada da droga, e as fêmeas parecem serem mais sensíveis aos sintomas de retirada.

Diferenças funcionais gênero-dependentes são observadas no eixo HPA (Rhodes 1999); machos e fêmeas respondem de maneira diferente em relação as concentrações séricas de corticosterona. Em ratos, as concentrações basais de ACTH e corticosterona são mais elevadas em fêmeas (Handa et al.,1994; Brett et al.,1986; Williams et al., 1985; Critchlow 1963; Kitay 1961;). Nossos dados corroboram os achados na literatura, já que os machos apresentaram redução das concentrações séricas em relação as fêmeas.

CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a exposição à nicotina durante a adolescência ou vida adulta afetou tanto os aspectos comportamentais como adrenais durante o período de exposição e os períodos de retirada da droga:

1.A exposição à nicotina durante as diferentes idades analisadas não afetou os comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, entretanto observamos diferenças entre sexo e períodos estudados somente durante a adolescência.

2.Identificamos alterações nos comportamentos avaliados no CA. Os animais expostos à nicotina durante a adolescência tiveram aumento da ambulação total, sugerindo uma hiperatividade nesses animais. Os animais expostos à nicotina na adolescência permaneceram mais tempo no centro, entretanto durante a vida adulta esse efeito foi dependente de sexo, as fêmeas exposta à nicotina permaneceram mais tempo no centro no período de 5 dias de retirada, sugerindo uma redução da ansiedade. O tempo na esquina para o grupo nicotina durante o período de exposição à droga foi aumentando, sugerindo assim aumento da ansiedade. Para as medidas de ambulação, os animais adultos expostos à nicotina tiveram redução na ambulação no centro durante o período de 10 dias de retirada, adicionalmente durante a adolescência as fêmeas nicotina tiveram aumento de ambulação na esquina durante o período de 5 dias de retirada. A exposição à nicotina não afetou o tempo na borda e a ambulação na borda.

3.Os testes comportamentais não promoveram variações no conteúdo de catecolaminas totais das medulas adrenais. O conteúdo de catecolaminas foi alterado pela exposição à nicotina, conforme avaliado nos animais não submetidos aos testes comportamentais. Nos animais adultos, a exposição à nicotina promoveu aumento deste conteúdo aos 10 dias de retirada da droga. Além disso, a nicotina aumentou o conteúdo de catecolaminas nos adultos, sem afetar os animais adolescentes. Em relação ao sexo, os machos apresentaram maior conteúdo em ambas as idades tanto nos animais testados quanto nos não testados.

4.A exposição à nicotina não promoveu alterações na expressão da TH durante a adolescência, porém os machos do grupo nicotina apresentaram menor expressão de TH em relação as fêmeas nicotina na vida adulta. Em relação ao sexo, a expressão de TH foi menor nos machos adultos.

5.O grupo de animais expostos à nicotina apresentou maiores concentrações de corticosterona nos animais submetidos aos testes comportamentais. Entretanto, nos animais não testados, a

exposição não afetou as concentrações de corticosterona em ambas as idades. Em relação ao sexo, os machos apresentaram menores concentrações de corticosterona tanto nos animais testados quanto nos não testados. Também observamos diferenças entre sexo e período nas duas idades estudadas em animais submetidos ou não ao teste. Quando analisamos somente os animais submetidos aos testes comportamentais, os animais expostos à nicotina durante a idade adulta tiveram maiores concentrações de corticosterona no período de 10 dias de retirada da droga.

REFERÊNCIAS

- 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, 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, Queiroz-Gomes F, 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. *Behavioural Brain Research,* 2006; 167:175-82.
- Abreu-Villaça Y, Seidle FJ, Slotkin TA. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Research,* 2003a; 97:114-28.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Slotkin TA. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology.* 2004b;29:1440-50.
- Abreu-Villaca Y, Seidler FJ, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. Prenatal nicotine exposure alters the response to nicotine administration in adolescence: effects on cholinergic systems during exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 2004a; 29: 879-890.
- Adriani W e Laviola G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology* 2000; 39: 334-346.
- Adriani W e Laviola G. Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice. *Behav. Neurosci.* 2003; 117: 695-703.
- Adriani W, Chiarotti F, Laviola G. Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behav. Neurosci.* 1998; 112: 1152-1166.
- Adriani W, Macri S, Pacifici R, e Laviola G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology* 2002a; 27: 212-224.
- Adriani W, Macri S, Pacifici R, Laviola G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology,* 2002; 27:212-224.

- Adriani,W, Granstrem,O, Macri,S, Izykenova,G, Dambinova,S, e Laviola,G. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:869-878.
- Adriani,W, Macri,S, Pacifici,R, e Laviola,G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology* 2002a;27:212-224.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M & Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009; 89, 73–120.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Braga MF & Alkondon M. Contribution of nicotinic receptors to the function of synapses in the central nervous system: the action of choline as a selective agonist of $\alpha 7$ receptors. *J Physiol Paris* 1998; 92, 309–316.
- Andersen A, Due P, Holstein BE, e Iversen L. Tracking drinking behaviour from age 15-19 years. *Addiction* 2003; 98: 1505-1511.
- Andersson K, Eneroth P e Agnati LF Nicotine-induced increases of noradrenaline turnover in discrete noradrenaline nerve terminal systems of the hypothalamus and the median eminence of the rat and their relationship to changes in the secretion of adenohipophyseal hormones. *Acta Physiol. Scand.*, 1981;113,227–231.
- Arai K, Kim K, Kaneko K, Iketani M, Otagiri A, Yamauchi N, e Shibasaki T. Nicotine infusion alters leptin and uncoupling protein 1 mRNA expression in adipose tissues of rats. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2001; 280:E867-E876.
- Arnett JJ. Adolescent storm and stress, reconsidered. *Am.Psychol.* 1999; 54: 317-326.
- Balfour DJ, Khullar AK, Longden A. Effects of nicotine on plasma corticosterone and brain amines in stressed and unstressed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1975;3: 179–84.
- Balfour DJ, Khullar AK, Longden A. Effects of nicotine on plasma corticosterone and brain amines in stressed and unstressed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1975;3:179–84.
- Balfour DJ. Influence of nicotine on the release of monoamines in the brain. *Prog. Brain Res.*,1989;79,165–172.
- Belluzzi JD, Lee AG, Oliff HS & Leslie FM. Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;174: 389–395.
- Belluzzi JD, Lee AG, Oliff HS, Leslie FM. Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;174:389–95.
- Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. 3rd Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol* 2009;29–60.

- Bergink V, van Megen HJ, Westenberg HG. Glutamate and anxiety. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2004; 14: 175-183.
- Brett LP, Levine R, Levine S. Bidirectional responsiveness of the pituitary-adrenal system in old and young male and female rats. *Neurobiol. Aging* 7:153–159; 1986.
- 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.
- Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJ, Decker MW. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *European Journal of Pharmacology*, 1993; 238: 108.
- Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJ, Decker MW. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated-plus maze test. *Eur J Pharmacol* 1993;238:1–8.
- Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJ, Decker MW. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated-plus maze test. *Eur J Pharmacol* 1993;238:1–8.
- Brody AL, Mandelkern MA, London ED, Olmstead RE, Farahi J, Scheibal D, Jou J, Allen V, Tionson E, Chefer SI, Koren AO & Mukhin AG. Cigarette smoking saturates brain $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63: 907–915.
- Broide RS e Leslie FM. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* 1999; 20:1–16.
- Brooks-Gunn J, Attie I. Developmental psychopathology in the context of adolescence. In: Lenzenweger MF, Haugaard JJ, editors. *Frontiers of developmental psychopathology*, New York, NY: Oxford University Press, 1996;148–89.
- Bugajski, J. Social stress adapts signaling pathways involved in stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Physiol Pharmacol.* 1999; 50: 367-379.
- Buisson B, Bertrand D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends in pharmacological sciences*, 2002; 23: 130-6.
- Cam GR, Bassett JR, Cairncross KD. The action of nicotine on the pituitary–adrenal cortical axis. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1979; 237, 49–66.
- Cam GR, Bassett JR. The effect of acute nicotine administration on plasma levels of the thyroid hormones and corticosterone in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;19: 559–61.
- Cam GR, Bassett JR. The effect of acute nicotine administration on plasma levels of the thyroid hormones and corticosterone in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;19:559–61.
- Cao J, Belluzzi JD, Loughlin SE, Dao JM, Chen Y & Leslie FM. Locomotor and stress responses to nicotine differ in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 96: 82–90.

Cao J, Belluzzi JD, Loughlin SE, Keyler DE, Pentel PR, Leslie FM. Acetaldehyde, a major constituent of tobacco smoke, enhances behavioral, endocrine, and neuronal responses to nicotine in adolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology* 2007a;32:2025–35.

Caraballo RS, Giovino GA, e Pechacek TF. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine.Tob.Res.* 2004a; 6: 19-25.

Carobrez,AP e Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2005; 29: 1193-1205.

Carr LA, Rowell PP, Pierce WM Jr. Effects of subchronic nicotine administration on central dopaminergic mechanisms in the rat. *Neurochem.Res.* 1989; 14: 511-515.

Casey B, Jones RM, Somerville LH. Braking and accelerating of the adolescent brain. *J Res Adolesc* 2011; 21, 21–33.

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.

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 H, Matta SG, Sharp BM. Acquisition of nicotine self-administration in adolescent rats given prolonged access to the drug. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32, 700–709.

Chen J, Millar WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Reports*, 1998; 9:39-46.

Chen K, Kandel DB. The natural history of drug use from adolescence to the mid-thirties in a general population sample. [American Journal of Public Health](#), 1995; 85:41-7.

Cheng SY, Glazkova D, Serova L, Sabban EL. Effect of prolonged nicotine infusion on response of rat catecholamine biosynthetic enzymes to restraint and cold stress. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2005; 82: 559-568.

Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 2001; 25: 235-260.

Cohen A, Young RW, Velazquez MA, Groysman M, Noorbehesht K, Ben-Shahar OM, et al. Anxiolytic effects of nicotine in a rodent test of approach–avoidance conflict. *Psychopharmacology* 2009;204:541–9.

Collins SL, Wade D, Ledon J, Izenwasser S. Neurochemical alterations produced by daily nicotine exposure in periadolescent vs. adult male rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 502, 75–85.

Conte-Devolx B, Oliver C, Giraud P, Gillioz P, Castanas E, Lissitzky JC, Boudouresque F, Millet Y. Effect of nicotine on in vivo secretion of melanocorticotropic hormones in the rat. *Life Sci.*, 1981;28,1067–1073.

Costall B, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES. The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 33:197–203.

Costall B, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES. The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;33:197–203.

Counotte DS, Goriounova NA, Li KW, Loos M, van der Schors RC, Schetters D, Schoffemeer AN, Smit AB, Mansvelter HD, Pattij T, Spijker S. Lasting synaptic changes underlie attention deficits caused by nicotine exposure during adolescence. *Nat Neurosci* 2011; 14, 417–419.

Counotte DS, Spijker S, Van de Burgwal LH, Hogenboom F, Schoffemeer AN, De Vries TJ, Smit AB, Pattij T. Long-lasting cognitive deficits resulting from adolescent nicotine exposure in rats. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34, 299–306.

Cox BC, Marritt AM, Perry DC, Kellar KJ. Transport of multiple nicotinic acetylcholine receptors in the rat optic nerve: high densities of receptors containing $\alpha 6$ and $\beta 3$ subunits. *J Neurochem*. 2008;105(5):1924-38.

Critchlow V, Liebelt RA, Bar-Sela M, Mountcastle W, Lipscomb HS. Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am. J. Physiol.*,1963;205:807–815.

Cruz FC, DeLucia R, Planeta CS. Effects of chronic stress on nicotine-induced locomotor activity and corticosterone release in adult and adolescent rats. *Addict Biol* 2008;13:63–9.
Dani JA & Balfour DJ. Historical and current perspective on tobacco use and nicotine addiction. *Trends Neurosci* 2011; 34, 383–392.

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 & Biasi MD. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001;70(4):439-46.

Dani JA, Radcliffe,KA, Pidoplichko,VI. Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *Eur.J.Pharmacol*. 2000; 393: 31-38.

Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day T.A. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur. J. Neurosci.*, 2001a; 14, 1143–1152.

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.

Doura MB, Gold AB, Keller AB, Perry DC. Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res* 2008; 1215: 40–52.

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

Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther* 2009; 122, 125–139.

Elliott BM, Faraday MM, Phillips JM, Grunberg NE. Adolescent and adult female rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. *Pharmacol.Biochem.Behav*, 2005; 80: 567-575.

Elliott BM, Faraday MM, Phillips JM, Grunberg NE. Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004; 77, 21–28.

Elliott BM, Grunberg NE. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behavioural Brain Research*, 2005; 165:187-196.

Eskenazi B, Prehn AW, Christianson RE. Passive and active maternal smoking as measured by serum cotinine: the effect on birth weight. *Am J Public Health*. 1995. 85(3): 395-398.

Falco AM, McDonald CG, Bachus SE, Smith RF. Developmental alterations in locomotor and anxiety-like behavior as a function of D1 and D2 mRNA expression. *Behav Brain Res* 2014; 260, 25–33.

Fenster CP, Hicks JH, Beckman ML, Covernton PJ, Quick MW, Lester RA. Desensitization of nicotinic receptors in the central nervous system. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 1999; 868: 620-623.

File SE, Cheeta S, Kenny PJ. Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *Eur J Pharmacol* 2000;393:231–6.

Filgueiras CC, Ribeiro-Carvalho A, Nunes F, Abreu-Villaça Y, Manhães AC. Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol.Biochem.Behav*, 2009; 93: 148-154.

Gaddnas H, Pietila K, Piepponen TP, Ahtee L. Enhanced motor activity and brain dopamine turnover in mice during long-term nicotine administration in the drinking water. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2001;70:497-503.

Garrido R, Mattson MP, Hennig B, Toborek M. Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. *J.Neurochem*. 2001; 76: 1395-1403.

Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC e Rapoport JL. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci* 1999;2, 861–863.

Gilbert DG, Robinson JH, Chamberlin CL, Spielberger CD. Effects of smoking/nicotine on anxiety, heart rate, and lateralization of EEG during a stressful movie. *Psychophysiology* 1989; 26: 311-320.

Ginzel KH, Maritz GS, Marks DF, Neuberger M, Pauly JR, Polito JR, Schulte-Hermann R, Slotkin TA. Critical review: nicotine for the fetus, the infant and the adolescent? *J Health Psychol* 2007; 12: 215–224.

Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF 3rd, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL & Thompson PM. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8174–8179.

Gogtay N, Thompson PM. Mapping gray matter development: Implications for typical development and vulnerability to psychopathology. *Brain Cogn* 2010; 72: 6–15.

Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 2004; 74:363–396.

Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27, 482–491.

Guyton and Hall. *Tratado de Fisiologia Médica*. Editora Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1996.

Hall CS. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal Comp. Psychol.*, 1934;18: 385– 403.

Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamopituitary- adrenal axis. *Horm. Behav.*, 1994;28:464–476.

Haycock JW. Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40. *J Biol Chem* 1990;265:11682–11691.

Henningfield JE, Miyasato K, Kasinski DR. Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1985; 234(1): 1-12.

Hiremagalur B, Nankova B, Nitahara J, Zeman R, Sabban EL. Nicotine increases expression of tyrosine hydroxylase gene. Involvement of protein kinase A-mediated pathway. *J Biol Chem* 1993;268:23704–23711.

Hochberg Z, Pacak K, Chrousos GP. Endocrine withdrawal symptoms. *Endocrine Reviews*, 2003;24:523-538.

Hughes J R, Gust SW, Skoog K, Keenan R M, Fenwick JW. Symptoms of tobacco withdrawal: a replication and extension. *Arch Gen Psychiatry* 1991; 48: 52–9.

Hughes JR, Arana G, Amori G, Stewart F, Workman R. Effect of tobacco withdrawal on the dexamethasone suppression test. *Biological Psychiatry*, 1988;23:96-98.

Hughes JR, Keely J, Naud S. Shape of the relapse curve and long-term abstinence untreated smokers. *Addiction*, 2004; 99(1): 29-38.

Hughes JR, Rose G, Callas PW. Do former smokers respond to nicotine differently from never smokers? A pilot study *Nicotine Tobacco Research*, 2000a; 2: 255-62.

Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*. 2005. 57(1):79-115.

IBGE. PNAD 2009 - Tabagismo. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2009; Disponível em: <http://www.antidrogas.com.br/ibge2009.php>. Acessado em 21/01/2016.

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.

Iñiguez SD, Warren BL, Parise EM, Alcantara LF, Schuh B, Maffeo ML, Manojlovic Z & Bolaños-Guzman CA. Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34, 1609–1624.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/numero_fumantes_cai_30_virgula_sete_por_cento_em_nove_anos. Acessado em 21/01/2016.

Irvine EE, Cheeta S, File SE. Time-course of changes in the social interaction test of anxiety following acute and chronic administration of nicotine. *Behavioural pharmacology*. 1999;10: 691-7.

Irvine EE, Bagnalasta M, Marcon C, Motta C, Tessari M, File SE, et al. Nicotine self-administration and withdrawal: modulation of anxiety in the social interaction test in rats. *Psychopharmacology* 2001;153:315–20.

Irvine EE, Cheet AS, File SE. Development of tolerance to nicotine's anxiogenic effect in the social interaction test. *Brain Research*, 2001a; 894:95-100.

Irvine EE, CheetAH S, Marshall M, File SE. Different treatment regimens and the development of tolerance to nicotine's anxiogenic effects. *Pharmacology, Biochemistry, and behavior*, 2001b; 68: 769-76.

Jernigan, TL, Trauner, DA, Hesselink, JR, e Tallal, PA. Maturation of human cerebrum observed in vivo during adolescence. *Brain* 1991; 114 (Pt 5): 2037-2049.

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

Kandel DB, Logan JA. Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: I. Periods of risk for initiation, continued use, and discontinuation. *American Journal of Public Health*, 1984; 74: 660-6.

Kanyt L, Stolerman IP, Chandler CJ, Saigusa T, Pogun S. Influence of sex and female hormones on nicotine-induced changes in locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;62:179–87.

Karlin, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat.Rev.Neurosci.* 2002; 3: 102-114.

Kassel JD, Unrod M. Smoking, anxiety, and attention: support for the role of nicotine in attentionally mediated anxiolysis. *Journal of abnormal psychology*, 2000 ;109:161-6.

Kitay JI. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology*, 1961;68:818–824.

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.

Kyerematen GA e Vesell ES. Metabolism of nicotine. *Drug Metab Rev.* 1991; 23: 3-41.

Lal H, Prather PL, e Rezazadeh SM. Anxiogenic behavior in rats during acute and protracted ethanol withdrawal: reversal by bupirone. *Alcohol* 1991; 8: 467-471.

Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev*,2003;27:19-31.

Leslie FM. Multigenerational epigenetic effects of nicotine on lung function. *BMC Med* 2013; 11, 27.

Levin ED, Lawrence SS, Petro A, Horton K, Rezvani AH, Seidler FJ, Slotkin TA. Adolescent vs. adult-onset nicotine self-administration in male rats: duration of effect and differential nicotinic receptor correlates. *Neurotoxicol Teratol* 2007; 29, 458–465.

Li W, Doyon WM, Dani JA. Acute in vivo nicotine administration enhances synchrony among dopamine neurons. *Biochem Pharmacol* 2011; 82, 977–983.

Little HJ. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol Res Health.* 2000;24(4):215-24.

Livingstone PD, Srinivasan J, Kew JN, Dawson LA, Gotti C, Moretti M, Shoaib M, Wonnacott S. $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors modulate dopamine release in vitro and in vivo in the rat prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 2009; 29, 539–550.

Luna B, Padmanabhan A & O’Hearn K. What has fMRI told us about the development of cognitive control through adolescence? *Brain Cogn* 2010; 72, 101–113.

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. *Anim Behav* 2002;64:541–6.

Malin DH. Nicotine dependence: studies with a laboratory model. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2001; 70: 551-559.

Marco EM, Llorente R, Moreno E, Biscaia JM, Guaza C, Viveros MP. Adolescent exposure to nicotine modifies acute functional responses to cannabinoid agonists in rats. *Behavior Brain Research*, 2006;172:46-53.

Markou A. Neurobiology of nicotine dependence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences*. 2008, 363(1507):3159–3168.

Matsuo N, Takao K, Nakanishi K, Yamasaki N, Tanda K, Miyakawa T. Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2010; 4: 29.

Matta SG, Beyer HS, McAllen KM, Sharp BM. Nicotine elevates rat plasma ACTH by a central mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;243:217–26.

Matta SG, Fu Y, Valentine JD, Sharp BM. Response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to nicotine. *Psychoneuroendocrinology* 1998;23:103–13.

McCormick CM, Mathews IZ. HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;86:220–33.

Meyer MR, Maurer HH. Absorption, distribution, metabolism and excretion pharmacogenomics of drugs of abuse. *Pharmacogenomics*. 2011; 12(2):215-33.

Molina, PE. *Fisiologia Endócrina (Lange)*. AMGH editora, Tradução da 4^o edição. Tradutores: Patrícia Lydie Voeux; Rubens Antunes da Cruz Filho. Porto Alegre, 2014.

Morissette SB, Tull MT, Gulliver SB, kamholz BW, Zimering RT. Anxiety, anxiety disorders, tobacco use, and nicotine: a critical review of interrelationships. [Psychology Bulletin](#) . 2007;133:245-72.

Natividad LA, Torres OV, Friedman TC & O'Dell LE. Adolescence is a period of development characterized by short- and long-term vulnerability to the rewarding effects of nicotine and reduced sensitivity to the anorectic effects of this drug. *Behav Brain Res* 2013; 257, 275–285.

Navegantes,LC, Resano,NM, Migliorini,RH, e Kettelhut,IC. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *Am.J.Physiol* 1999b; 277: E883-E889.

Nel MR e Morgan M. *Anaesthesia*. 1996. 51(4):309-311.

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.

Nuutinen S, Ahtee L, Tuominen RK. Time and brain region specific up-regulation of low affinity neuronal nicotinic receptors during chronic nicotine administration in mice. *European Journal Pharmacology*, 2005;515:83-89.

O'Dell LE, Bruijnzeel AW, Smith RT, Parsons LH, Merves ML, Goldberger BA, Richardson HN, Koob GF & Markou A. Diminished nicotine withdrawal in adolescent rats: implications for vulnerability to addiction. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 186, 612–619.

Ostby Y, Tamnes CK, Fjell AM, Westlye LT, Due-Tønnessen P & Walhovd KB . Heterogeneity in subcortical brain development: a structural magnetic resonance imaging study of brain maturation from 8 to 30 years. *J Neurosci* 2009; 29, 11772–11782.

Ouagazzal AM, Kenny PJ, File SE. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated-plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology*, 1999; 144: 54-60.

Parrot AC. Cigarette-derived nicotine is not a medicine. *World Journal of Biology Psychiatry*, 2003; 4: 49-55.

Pauly JR, Grun EU, Collins AC. Tolerance to nicotine following chronic treatment by injections: a potential role for corticosterone. *Psychopharmacology (Berl)* 1992; 108: 33-39.

Paus T. Growth of white matter in the adolescent brain: Myelin or axon? *Brain Cogn*, 2010; 72, 26–35.

Pellow S, Chopin P, File SE, e Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1985a; 14: 149-167.

Pentel PR, Keyler DE, Chen Y, LeSage MG, Dufek MB, Le C & Leslie FM. Vaccination against nicotine does not prevent nicotine-induced changes in fetal nicotinic receptor binding and c-fos mRNA expression in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2006; 28, 589–596.

Pérez-Alvarez A, Hernández-Vivanco A, McIntosh JM, Albillos A. Native $\alpha 6\beta 4^*$ nicotinic receptors control exocytosis in human chromaffin cells of the adrenal gland. *The FASEB Journal*, 2012; 26(1):346-54.

Perry DC, Xiao Y, Nguyen HN, Musachio JL, Davila-Garcia MI & Kellar KJ. Measuring nicotinic receptors with characteristics of $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ subtypes in rat tissues by autoradiography. *J Neurochem* 2002; 82, 468–481.

Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, 2002; 13:1097-106.

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

Pomerleau OF. Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. *Psychopharmacology Bulletin*, 1986; 22: 865-869.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. Tradução da 5^o edição. Tradutores: Patrícia Lydie Voeux; Antônio José Magalhães da Silva Moreira. Rio de Janeiro. Elsevier, 2004.

Reseland JE, Mundal HH, Hollung K, Haugen F, Zahid N, Anderssen SA, Drevon CA. Cigarette smoking may reduce plasma leptin concentration via catecholamines.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2005. 73:43-9.

Rhodes ME, O'Toole SM, Czambel RK, Rubin RT. Male-female differences in rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to nicotine stimulation. *Brain Res Bull* 2001;54:681–8.

Rhodes ME, Rubin RT. Functional sex differences (“sexual diergism”) of central nervous system cholinergic systems, vasopressin, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mammals: A selective review. *Brain Res. Rev.*,1999;30:135–152.

Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Nicotine and ethanol interact during adolescence: effects on the central cholinergic systems. *Brain Res.*,2008;26(1232):48-60.

Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Medeiros AH, Siqueira NR, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaca Y. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience* 2009; 162: 1174-1186.

Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Nunes-Freitas AL, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaca Y. Exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on depressive-like behavior during exposure and withdrawal. *Behav. Brain Res.* 2011; 221: 282-289.

Rose JE e Corrigall WA. Nicotine self-administration in animals and humans: Similarities and differences. *Psychopharmacology*, 1997; 130(1): 28-40.

Rosemberg, J. Nicotina: droga universal. SESC/CVE, Sao Paulo, 2004.

Sala F, Nistri A, Criado M. Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 2008;19:203–212.

Sala F, Nistri A, Criado, M. Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 192: 203-212.

Sala-Roca J, Marti-Carbonell MA, Garau A, Darbra S, e Balada F. Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 72: 643-650.

Sansar W, Ahboucha S, Gamrani H. Chronic lead intoxication affects glial and neural systems and induces hypoactivity in adult rat. *Acta Histochemica*, 2010; 23.

Schneider M. Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res* 2013; 354, 99–106.

Shiffman SM e Jarvik ME. Smoking withdrawal symptoms in two weeks of abstinence. *Psychopharmacology*, 1976; 50 (1): 35-39.

Shram MJ, Funk D, Li Z, Lê AD. Periadolescent and adult rats respond differently in tests measuring the rewarding and aversive effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 186, 201–208.

Shram MJ, Siu EC, Li Z, Tyndale RF & Lê AD. Interactions between age and the aversive effects of nicotine withdrawal under mecamylamine-precipitated and spontaneous conditions in male Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 198, 181–190.

Sisk CL e Zehr JL. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol* 2005; 26, 163–174.

Slawecki CJ, Ehlers CL. Lasting effects of adolescent nicotine exposure on the electroencephalogram, event related potentials, and locomotor activity in the rat. *Brain Research. Developmental Brain Research*,2002;138:15-25.

Slawecki CJ, Gilder A, Roth J, Ehlers CL. Increased anxiety-like behavior in adult rats exposed to nicotine as adolescents. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75, 355–361.

Slotkin TA, Seidler FJ. Acute and chronic effects of nicotine on synthesis and storage of catecholamines in the rat adrenal medulla. *Life Sc* 1975;16:1613–1622.

Slotkin TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198, 132–151.

Smith LN, McDonald CG, Bergstrom HC, Brielmaier JM, Eppolito AK, Wheeler TL, Falco AM & Smith RF . Long-term changes in fear conditioning and anxiety-like behavior following nicotine exposure in adult versus adolescent rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 85, 91–97.

Smith SS. $\alpha 4\beta\delta$ GABAA receptors and tonic inhibitory current during adolescence: effects on mood and synaptic plasticity. *Front Neural Circuits* 2013; 7, 135.

Snedecor GW e Cochran WG. *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology*. State University Press, Iowa, 1967.

Sowell ER, Delis D, Stiles J & Jernigan TL. Improved memory functioning and frontal lobe maturation between childhood and adolescence: a structural MRI study. *J Int Neuropsychol Soc* 2001; 7, 312–322.

Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, Bath R, Jernigan TL & Toga AW. Localizing age-related changes in brain structure between childhood and adolescence using statistical parametric mapping. *Neuroimage* 1999; 9, 587–597.

Sparks JA, Pauly JR. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57B1/6 mice. *Psychopharmacology*, 1999;141:145-153.

Spear LP, Shalaby IA, Brick J. Chronic administration of haloperidol during development: behavioral and psychopharmacological effects. [Psychopharmacology](#), 1980; 70: 47-58.

Spear LP. Adolescent neurodevelopment. *J Adolesc Health* 2013; 52, S7–13.

Spear LP. Assessment of adolescent neurotoxicity: rationale and methodological considerations. *Neurotoxicol Teratol* 2007; 29, 1–9.

Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2000c; 24: 417-463.

Spear,LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2000; 24: 417-463.

Stellman SD e Djordjevic MV. Monitoring the tobacco use epidemic II: The agent: Current and emerging tobacco products. *Preventive medicine.* 2009. 48 :S11-S15.

Sun,B e Tank,AW. Overexpression of c-Fos is sufficient to stimulate tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription in rat pheochromocytoma PC18 cells. *J.Neurochem.* 2002; 80: 295-306.

Szyndler J, Sienkiewicz-Jarosz H, Maciejak P, Siemiatkowski M, Rokicki D, Czlonkowska AI, Plaznik A. The anxiolytic-like effect of nicotine undergoes rapid tolerance in a model of contextual fear conditioning in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001; 69, 511–518.

Taylor CB, Miller NH, Herman S, Smith PM, Sobel D, Fisher L, DeBusk RF. A nurse-managed smoking cessation program for hospitalized smokers. *Am.J.Public Health* 1996; 86: 1557-1560.

Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2003; 27: 33-44.

Tirelli E, Laviola G, Adriani W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents *Neurosci Biobehav Rev*,2003;27:163-178.

Torres OV, Tejada HA, Natividad LA, O'Dell LE. Enhanced vulnerability to the rewarding effects of nicotine during the adolescent period of development. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90, 658–663.

Trauth JA, Seidler FJ & Slotkin TA. Persistent and delayed behavioral changes after nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res* 2000; 880, 167–172.

Trevenzoli IH, Valle MM, Machado FB, Garcia RM, Passos MC, Lisboa PC, e Moura EG. Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J.Physiol* 2007b.

Tziomalos K e Charsoulis F. Endocrine effects of tobacco smoking. *Clinical Endocrinology*, 2004; 61(6): 664-674.

Ulusu U, Uzbay IT, Kayir H, Alici T, Karakas S. [Evidence for the role of nitric oxide in nicotine-induced locomotor sensitization in mice.](#) *Psychopharmacology (Berl)*, 200;178(4):500-4.

Vale AL, Green S. Effects of chlordiazepoxide, nicotine and d-amphetamine in the rat potentiated startle model of anxiety. *Behav Pharmacol* 1996;7:138–43.

Van Eden CG, Kros JM, Uylings HB. The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. *Prog.Brain Res.* 1990; 85: 169-183.

Varlinskaya EI, Vetter-O'Hagen CS e Spear LP. Puberty and gonadal hormones: role in adolescent-typical behavioral alterations. *Horm Behav* 2013; **64**, 343–349.

Vastola BJ, Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP. Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rats. *Physiol Behav* 2002; **77**, 107–114.

Vetter-O'Hagen CS e Spear LP. Hormonal and physical markers of puberty and their relationship to adolescent-typical novelty-directed behavior. *Dev Psychobiol* 2012; **54**, 523–535.

Volkow ND e Li TK. Drugs and alcohol: treating and preventing abuse, addiction and their medical consequences. *Pharmacol. Ther.* 2005; **108**: 3-17.

Wakade AR e Wakade TD. Contribution of nicotinic and muscarinic receptors in the secretion of catecholamines evoked by endogenous and exogenous acetylcholine. *Neuroscience*, 1983; **10**(3):973-8.

Wallace JR JM, Bachman JG, O' Marlley PM, Schulenberg JE, Cooper SM, Johnston LD. Gender and ethnic differences in smoking, drinking illicit drug use among American 8th, 10th and 12th grade students, 1976-2000. *Addiction*, 2003; **98**: 225-34.

Wang H e Sun X. Desensitized nicotinic receptors in brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005; **48**: 420-437.

Watkins SS, Koob GF, Markou A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine Tobacco Research*, 2000; **2**: 19-37.

Williams TDM, Carter DA, Lightman SL. Sexual dimorphism in the posterior pituitary response to stress in the rat. *Endocrinology*, 1985; **116**: 738–740.

Wonnacott, S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 1997; **20**: 92-98.

World Health Organization (WHO). WHO Report on The global tobacco epidemic, 2015. Raising taxes on tobacco. 2015.

Yuan M, Cross J S, Loughlin S E, Leslie FM. Nicotine and adolescent brain. *J Physiol* 2015; **593**.16: 3397–3412.

Zarrindast MR, Aghamohammadi-Sereshki A, Rezayof A, Rostami P. Nicotine-induced anxiogenic-like behaviours of rats in the elevated plus-maze: possible role of NMDA receptors of the central amygdala. *J Psychopharmacol* 2012; **26**: 555–63.

Zhao-Shea R, Liu L, Soll LG, Impropgo MR, Meyers EE, McIntosh JM, Grady SR, Marks MJ, Gardner PD & Tapper AR. Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 2011; **36**, 1021–1032.

Zhao-Shea R, Liu L, Soll LG, Impropgo MR, Meyers EE, McIntosh JM, Grady SR, Marks MJ, Gardner PD & Tapper AR. Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 2011; **36**, 1021–1032.

Zoli M, Le NN, Hill JA, Jr., Changeux JP. Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* 1995; 15: 1912-1939.

Zubkov EA, Kulikov AV. Effect of thyroxin on behavior of mice with inherited difference in predisposition to catalepsy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009; 147:217-219.