



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

Victor de Freitas Naiff

**Nicotina e/ou estresse por contenção durante a adolescência de  
camundongos: efeitos em comportamentos de ansiedade, sociabilidade e  
comportamentos associados à depressão**

Rio de Janeiro

2014

Victor de Freitas Naiff

**Nicotina e/ou estresse por contenção durante a adolescência de camundongos: efeitos em comportamentos de ansiedade, sociabilidade e comportamentos associados à depressão**

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Yael de Abreu Villaça

Rio de Janeiro

2014

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

N155 Naiff, Victor de Freitas.

Nicotina e/ou estresse por contenção durante a adolescência de camundongos: efeitos em comportamentos de ansiedade, sociabilidade e comportamentos associados à depressão / Victor de Freitas Naiff. – 2014.  
74 f.

Orientador: Anderson Ribeiro Carvalho.

Coorientadora: Yael de Abreu Villaça.

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

1. Fumo e juventude – Vício - Teses. 2. Adolescentes - Teses. 3. Ansiedade na adolescência - Teses. 4. Adolescentes – Conduta - Teses. 5. Nicotina - Teses. 6. Transtorno por uso de tabaco. 7. Camundongo como animal de laboratório - Teses. I. Carvalho, Anderson Ribeiro. II. Villaça, Yael de Abreu. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 613.84-053.6

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

---

Assinatura

Data

Victor de Freitas Naiff

**Nicotina e/ou estresse por contenção durante a adolescência de camundongos: efeitos em comportamentos de ansiedade, sociabilidade e comportamentos associados à depressão**

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

Aprovada em 14 de março de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho  
Faculdade de Formação de Professores - UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Yael de Abreu Villaça  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dr. Alex Christian Manhães  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elaine de Oliveira  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tânia Marcourakis  
Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro

2014

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho ao meu pai, a quem a conclusão deste trabalho trouxe muita alegria em seus últimos dias.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Anderson, pela orientação e pela participação como colaborador. As suas ajudas ao longo do processo foram fundamentais para que esse trabalho fosse concluído, especialmente nessa etapa final.

À minha coorientadora Yael, pela oportunidade dada, pelas dúvidas tiradas múltiplas vezes e pela minha formação científica no geral, desde os meus primórdios como estagiário.

Aos meus pais, Ronaldo e Rose, que me estimularam e fomentaram intelectualmente desde muito cedo e fornecendo o ambiente mais enriquecido que puderam oferecer, muitas vezes à custa de seu próprio bem estar. Sem eles, essa dissertação não seria nem cogitada.

À minha melhor amiga, noiva e companheira para todas as horas Marina, por aguentar a minha ausência constante durante esse período, por me ajudar inúmeras vezes ao longo do projeto, ao ponto de perder vários finais de semana e feriados para me trazer almoço, lanche ou um beijo. Mas especialmente, por me fazer o bem que você fez e faz. Sinceramente, faltam folhas pra te agradecer devidamente. Obrigado por tudo.

À minha colaboradora Bruna, que também dividiu comigo alguns dos desafios desse projeto, e que também foi de ajuda essencial para a conclusão desse projeto.

Aos professores Cláudio e Alex, por fazerem do laboratório um lugar mais agradável e pelos inúmeros ensinamentos. E pelo café.

Aos grandes amigos Fernanda, Sylvio e Anna, que além da amizade, me quebraram muitos galhos indigestos, e me ensinaram muito nesse processo, muito por lições, muito por exemplo. Aprendi muita humanidade com cada um de vocês.

E aos não menos importantes bons amigos que fiz no laboratório de Neurofisiologia, que fizeram meus momentos por aqui serem muito agradáveis, momentos os quais eu sempre lembrarei. Apesar de não caberem nome a nome pela falta de espaço, vocês sabem quem são! Obrigado!

E aos que desempenharam o papel mais importante, os camundongos utilizados, que doaram involuntariamente as suas vidas e bem estar a esse projeto. A vocês, as minhas mais sinceras desculpas. Estou em eterna dívida com vocês e farei o possível para honrá-la.

A atitude científica da mente envolve varrer todos os outros  
desejos em prol do desejo de saber.

*Bertrand Russell*

## RESUMO

NAIFF, Victor de Freitas. *Nicotina e/ou estresse por contenção durante a adolescência de camundongos*: efeitos em comportamentos de ansiedade, sociabilidade e comportamentos associados à depressão. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Há um extenso número de evidências apontando para o estresse como tendo um papel crítico na iniciação, manutenção e relapso após a retirada, do hábito do tabagismo. De modo geral, adolescentes são mais sensíveis aos efeitos no sistema nervoso central de ambos estresse e nicotina, principal componente psicoativo do cigarro. No entanto, há uma escassez de estudos em neurobiologia básica que avaliem as possíveis interações entre os efeitos no sistema nervoso central entre nicotina e estresse nesta idade. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição à nicotina e estresse durante a adolescência de camundongos em comportamentos sociais e comportamentos associados a ansiedade e depressão. Para este estudo utilizamos camundongos Suíços de ambos os sexos. A partir do 30º dia pós-natal (PN) camundongos foram expostos à nicotina (até PN40) e/ou estresse (até PN38 para os animais avaliados em PN39-40 e PN40 para os animais avaliados nas outras idades). Desta forma, utilizamos quatro grupos experimentais: 1) Exposição concomitante de solução de nicotina (diluída na água potável, 50µg/ml) e estresse por contenção (1h/dia); 2) Exposição somente à nicotina via oral; 3) Exposição somente ao estresse por contenção; 4) Grupo controle. Para a avaliação comportamental utilizamos: o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), o teste de abordagem social de três câmaras (TS) e o teste do nado forçado (FST). Cada animal foi avaliado nos três testes, em um entre três momentos: ao final do período de exposição (PN39/40), após um curto período a partir do término da exposição (PN44/45) ou na vida adulta (PN69/70). A exposição ao estresse promoveu menor ganho de massa corporal durante a adolescência, sendo o consumo de nicotina incapaz de alterar este parâmetro. Além disso, o estresse não afetou o consumo da solução de nicotina. Nosso modelo não foi capaz de alterar os parâmetros de ansiedade avaliados pelo teste do LCE. Entretanto, a exposição de estresse em concomitância com nicotina gerou hiperatividade ao final do período de exposição em ambos os sexos. Na avaliação do TS e do FST observamos alterações significativas somente após período de retirada. Após um curto período de abstinência pela nicotina, fêmeas apresentaram aumento do comportamento associado à depressão, tendo este efeito sido revertido pela exposição concomitante ao estresse. De forma contrária, na mesma idade, somente a exposição combinada promoveu aumento do comportamento associado à depressão em machos. Além disso, nossos resultados sugerem um aumento de sociabilidade no grupo submetido a exposição combinada após longo período de interrupção da exposição durante a vida adulta. O presente trabalho fornece evidências experimentais que indicam que nicotina e estresse interagem durante a adolescência resultando em alterações na resposta emocional durante o período de exposição e tardiamente, após a sua interrupção causando alterações que perduram até o início da vida adulta.

Palavras-chave: Adolescência. Nicotina. Estresse. Ansiedade. Depressão. Sociabilidade. Camundongos.



## ABSTRACT

NAIFF, Victor de Freitas. *Nicotine and/or restraint stress during mice adolescence: effects on anxiety-like, sociability and depression-like behaviors*. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Extensive evidence points out to psychological stress as having a key role in initiation, maintenance and relapse after withdrawal, of cigarette smoking. Adolescents tend to be more sensitive to the central nervous system's effects of both psychological stress and nicotine, the main psychoactive compound in cigarettes. However, there are few basic neurobiology studies evaluating the possible interactions between nicotine and psychological stress at this age. Therefore, our objective was to study the effects of nicotine and stress exposure during adolescence on anxiety-like, social and depressive-like behaviors in mice. For this study, we have used male and female Swiss mice. Starting on the 30th post-natal day (PN), mice were exposed to nicotine (ending on PN40) and/or stress (ending in PN38 for mice evaluated on PN39/40, and on PN40 for mice evaluated at other ages). Thus, four experimental groups were formed: 1) Simultaneous exposure to nicotine (drinking water, 50µg/ml) and restraint stress (1h/day); 2) Nicotine-only exposure; 3) Stress-only exposure; 4) Control group. For behavioral assessment, we utilized: elevated plus-maze test (EPM), three-chambered social approach (TS) and forced swimming test (FST). We evaluated each animal on all tests at one among three time points: At the end of the exposure (PN39/40), after a short period of withdrawal (PN44/45) and at adulthood (PN69/70). Stress exposure reduced body mass gain during adolescence while nicotine had no effect on body mass during the same period. Also, stress did not affect nicotine consumption. Our model was not capable of altering anxiety parameters evaluated in EPM. However, stress+nicotine exposure caused hyperactivity at the end of exposure in both sexes. Concerning TS and FST, we have only observed significant behavioral differences after the end of the exposure. In a short period of withdrawal, nicotine-only exposed females showed an increase in depressive-like behavior, an effect that disappeared by simultaneous stress exposure. Conversely, in the same age, only combined exposure promoted an increase of depressive-like behavior in males. Our data also suggests a long-term increase of sociability in stress+nicotine exposed mice. This work provides experimental evidence for an interaction between nicotine and stress exposure in adolescence resulting in immediate, short-term and long-term alterations in emotional responses.

Keywords: Adolescence. Nicotine. Stress. Anxiety. Depression. Sociability. Mice.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fotografia do tubo Falcon adaptado para a exposição ao estresse por contenção.....	25
Figura 2 –	Fotografia das pipetas volumétricas utilizadas para administração das soluções de nicotina+sacarina e sacarina .....	26
Figura 3 –	Fotografia em vista superior do labirinto em cruz elevado .....	29
Figura 4 –	Fotografia do teste de sociabilidade .....	31
Figura 5 –	Fotografia com visão lateral do recipiente preenchido com água utilizado para a realização do teste do nado forçado .....	32

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos 1 –	Ganho de massa corporal ao longo do tratamento.....	36
Gráficos 2 –	Ingestão de líquido ao longo do tratamento.....	37
Gráficos 3 –	Parâmetros de ansiedade em PN39.....	39
Gráfico 4 –	Parâmetros de tomada de decisão PN39.....	40
Gráficos 5 –	Parâmetros de atividade locomotora em PN39.....	41
Gráficos 6 –	Parâmetros de ansiedade em PN44.....	42
Gráficos 7 –	Parâmetros de tomada de decisão em PN44.....	43
Gráficos 8 –	Parâmetros de atividade locomotora em PN44.....	43
Gráficos 9 –	Parâmetros de ansiedade em PN69.....	44
Gráficos 10 –	Parâmetros de tomada de decisão em PN69.....	45
Gráficos 11 –	Parâmetros de atividade locomotora em PN69.....	45
Gráficos 12 –	Parâmetros de sociabilidade em PN40.....	46
Gráficos 13 –	Parâmetros de sociabilidade em PN45.....	48
Gráficos 14 –	Parâmetros de sociabilidade em PN70.....	49
Gráficos 15 –	Parâmetros de comportamento associado à depressão em PN40.....	50
Gráficos 16 –	Parâmetros de comportamento associado à depressão em PN45.....	52
Gráficos 17 –	Parâmetros de comportamento associado à depressão em PN70.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de Variância
ANOVA <sub>r</sub>	Análise de Variância de repetição
BA	Braço aberto do teste de labirinto em cruz elevado
BF	Braço fechado do teste de labirinto em cruz elevado
CONT	Grupo controle
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FPLSD	<i>Fisher's Protected Least Significant Difference Test</i>
FST	Teste do nado forçado
h	Horas
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
LCE	Teste de labirinto em cruz elevado
NIC	Grupo exposto a nicotina
NIC+ST	Grupo exposto a nicotina e submetido ao estresse
PN	dia de vida pós-natal
s	Segundos
SNC	Sistema nervoso central
ST	Grupo submetido ao estresse
TS	Teste social de três câmaras

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mg	Miligramas
°C	Graus-Celsius
+	Mais
µg	Microgramas
mL	Mililitros
kg	Kilogramas
cm	Centímetro
=	Igual
g	Gramas
P	Valor de Prova
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
♀	Fêmea
♂	Macho

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
1.1	<b>Geral</b> .....	22
1.2	<b>Específicos</b> .....	22
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
2.1	<b>Modelo experimental</b> .....	23
2.2	<b>Formação dos grupo experimentais</b> .....	24
2.2.1	<u>Exposição ao estresse por contenção</u> .....	25
2.2.2	<u>Exposição a nicotina por via oral</u> .....	26
2.3	<b>Ingestão de líquido, massa corporal e consumo de nicotina</b> .....	27
2.4	<b>Testes comportamentais</b> .....	27
2.4.1	<u>Labirinto em cruz elevado</u> .....	28
2.4.2	<u>Teste social de três câmaras</u> .....	30
2.4.3	<u>Nado forçado</u> .....	31
2.5	<b>Análises estatísticas</b> .....	33
2.5.1	<u>Análise da massa corporal e ingestão de líquidos</u> .....	33
2.5.2	<u>Análise comportamental (LCE, TS e FST)</u> .....	33
3	<b>RESULTADOS</b> .....	35
3.1	<b>Massa corporal e ingestão de líquidos</b> .....	35
3.2	<b>Avaliação comportamental</b> .....	38
3.2.1	<u>Labirinto em cruz elevado</u> .....	38
3.2.1.1	Labirinto em cruz elevado ao final do período de exposição (PN39) .....	38
3.2.1.2	Labirinto em cruz elevado após um curto período de retirada (PN44) .....	41
3.2.1.3	Labirinto em cruz elevado após um longo período de retirada (PN69) .....	44
3.2.2	<u>Teste social de três câmaras</u> .....	45
3.2.2.1	Teste social de três câmaras ao final do período de exposição (PN40) .....	46
3.2.2.2	Teste social de três câmaras após um curto período de retirada (PN45) .....	47
3.2.2.3	Teste social de três câmaras após um longo período de retirada (PN70) .....	49
3.2.3	<u>Teste do nado forçado</u> .....	50
3.2.3.1	Teste do nado forçado ao final do período de exposição (PN40) .....	50

3.2.3.2	Teste do nado forçado após um curto período de retirada (PN45) .....	51
3.2.3.3	Teste do nado forçado após um longo período de retirada (PN70) .....	52
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
4.1	<b>Resumo dos resultados</b> .....	54
4.2	<b>Alterações em ingestão de líquido e massa corporal</b> .....	55
4.3	<b>Efeitos da nicotina e/ou estresse sobre ansiedade, tomada de decisão e atividade locomotora</b> .....	56
4.4	<b>Efeitos da nicotina e/ou estresse sobre o comportamento social</b> .....	58
4.5	<b>Efeitos da nicotina e/ou estresse sobre o comportamento tipo depressivo.....</b>	59
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	61

## INTRODUÇÃO

Mais de 450 milhões de pessoas sofrem de transtornos psiquiátricos no mundo (WHO, 2010). Os problemas relacionados a saúde mental são de grande prejuízo para o indivíduo, para os que convivem com ele e para a sociedade. Nos Estados Unidos, somente em 2002, o prejuízo estimado decorrente de transtornos psiquiátricos foi de cerca de 300 bilhões de dólares (CDC, 2002).

É conhecido que muitos transtornos psiquiátricos tendem a se manifestar após experiências estressantes (Rutter, 2000). Entre eles estão inclusos os transtornos do humor, como ansiedade generalizada (Michl et al., 2013) e social (Erwin et al. 2006), depressão (Michl et al., 2013) e abuso de drogas (Duffing et al., 2014).

Adolescência é definida como o período de transição gradual entre a infância e a fase adulta. Desta forma, a adolescência não é sinônima de puberdade. A puberdade é uma fase mais discreta durante a qual alterações fisiológicas e neuroendócrinas associadas com a maturação sexual ocorrem. A puberdade é apenas uma das alterações ontogenéticas que ocorrem durante a adolescência com sua duração compreendida dentro do processo de adolescência, variando consideravelmente entre humanos (Dubas, 1991).

O limite temporal da adolescência não é de fácil definição. Em algumas espécies é difícil caracterizar quando a transição para adolescência começa a acontecer e quando o indivíduo passa de adolescente a adulto. Em roedores, como ratos e camundongos, as primeiras alterações associadas à adolescência podem ocorrer já a partir do vigésimo dia de vida pós-natal (PN20) e as últimas mudanças podem ocorrer até PN55. Em primatas não humanos, a adolescência ocorre geralmente entre 2 e 4 anos de vida (Lewis, 1997); em humanos, a adolescência é comumente definida como a segunda década de vida (Petersen et al., 1996), além disso, alguns autores consideram ainda idades acima de 25 anos como “adolescência tardia” (Baumrind, 1987).

Na adolescência o indivíduo adquire características importantes para a vida adulta, como aumento de massa muscular, maturidade sexual, maturação das funções imunes e habilidades cognitivas (Dahl, 2004). Dentre essas habilidades cognitivas destacam-se o amadurecimento da previsão de consequências e controle de impulsos, devido ao desenvolvimento das áreas cerebrais responsáveis por essas funções (Casey et al., 2005).

O cérebro é o órgão com maior tempo de formação e a adolescência é a etapa final de transformação do cérebro na sua forma adulta. Assim, o cérebro passa por um notável



desenvolvimento ao longo da adolescência (Sowell et al., 1999; Galván et al., 2006; Eiland e Romeo, 2013). Na adolescência ainda há proliferação de neurônios, apoptose e rearranjo sináptico (Altman e Bayer, 1990; Bayer 1983; Bayer et al., 1982; Huttenlocher, 1990; McWilliams e Lynch, 1983). As mudanças estruturais se dão principalmente em estruturas límbicas e no córtex pré-frontal o que explica, ao menos em parte, as alterações comportamentais da adolescência relativas ao caráter emocional, controle de impulsos, tomada de decisões e comportamento de risco/busca por novidades (Spear 2000; De Bellis et al. 2001; Powell 2006). Embora essas alterações estruturais e funcionais sejam essenciais para o amadurecimento até a fase adulta, tornam essa etapa do desenvolvimento particularmente vulnerável à prejuízos a longo prazo induzido por insultos, como drogas de abuso ou estresse psicológico (Andersen, 2003; Dahl 2004; Konrad et al., 2013).

Estresse é o desafio enfrentado pelo organismo quando este é confrontado com experiências potencialmente prejudiciais, os chamados “agentes estressores” ou somente “estressores”.

O “bom estresse” se refere a experiências de duração limitada e as quais o indivíduo consegue resolver, dando uma sensação de satisfação pela superação. Já o “estresse ruim”, “estar estressado” ou simplesmente “estresse” refere-se a experiências onde há ausência ou escassez de controle sobre a situação e que são frequentemente prolongadas ou recorrentes, irritantes, fisicamente e/ou emocionalmente exaustivas ou perigosas.

O cérebro é o órgão responsável por interpretar experiências como ameaçadoras ou não, e determina as respostas comportamentais e fisiológicas a cada situação. Frente ao evento estressor, alterações psicológicas e fisiológicas são acionadas de modo a proteger o organismo. Dentre as características chaves da resposta ao estresse estão a ativação do sistema nervoso autônomo (Jansen et al., 1995) e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Engelmann et al., 2004). Para superar situações adversas (ex: predadores, desastres naturais) o organismo precisa de uma resposta fisiológica adequada, e funções adrenocorticais e autonômicas inadequadas ou excessivas são deletérias para a saúde e sobrevivência. O humano é especialmente afetado pelo estresse, pois a preocupação antecipada e a ruminação (termo usado em psiquiatria para denominar o ato de compulsivamente relembrar momentos estressantes e ponderar suas causas e conseqüências (Pedersen et al., 2011)), o que leva a um desencadeamento repetido das respostas fisiológicas ao estresse, mesmo quando o agente estressor não está presente (Sapolsky, 2004).

Após a percepção do agente estressor, atribuída principalmente à amígdala e ao hipocampo, o hipotálamo sinaliza à hipófise, através do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (Guyton e Hall, 2011), para secretar um segundo mediador hormonal denominado hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Guyton e Hall, 2011). No córtex da adrenal, o ACTH promove a liberação de corticosteróides (cortisol em humanos). A principal função adaptativa do aumento de glicocorticoides circulantes é a mobilização de energia para permitir a sobrevivência e a desaceleração de processos de função secundária no momento do evento estressor, como reparo tecidual e resposta imune (Sapolsky, 2004). Paralelamente, há a sinalização para uma maior atividade simpática do sistema nervoso autônomo, responsável pela resposta imediata do organismo ao estressor. Essa resposta é didaticamente chamada de resposta de “luta ou fuga” e é a maneira clássica de visualizar as respostas comportamentais e fisiológicas à uma ameaça em uma situação adversa. Esta resposta tem ação mais rápida que a dos glicocorticoides e é caracterizada por maior atividade cardíaca e respiratória, redirecionamento do fluxo de sangue para os músculos esqueléticos e liberação de fontes metabólicas de energia para consumo muscular.

Além do hipotálamo e do tronco encefálico, que são essenciais para a resposta autônoma e neuroendócrina a estressores, áreas cognitivas superiores têm participação chave em memória, ansiedade e tomada de decisões. Essas áreas são alvos do estresse e dos hormônios mediadores do estresse, e os efeitos agudos e crônicos de experiências estressoras influenciam as respostas das mesmas. Já as respostas psicológicas e comportamentais a estressores, chamadas “estratégias adaptativas”, “respostas adaptativas” ou “*coping*”, são variáveis, variando de acordo com o agente estressor e às características do indivíduo, como sexo, idade, perfil genético e experiências anteriores. Centenas de estratégias adaptativas já foram identificadas. Weiten e Lloyd (2008) apresentam um resumo de três grandes classes de estratégias adaptativas, sendo essas cognitivas (o indivíduo altera o modo de pensar sobre o evento de modo a lidar com o estressor, por exemplo, a negação ou distanciamento), direcionadas ao problema (estratégias comportamentais voltadas para reduzir ou eliminar o estressor) e emocionais (abordar o agente estressor com uma resposta emocional de modo a alterar a percepção do estresse, por exemplo, hostilidade e a agressão deslocada).

Em comparação a outros períodos do desenvolvimento, a adolescência é marcada por experiências estressantes e maior reatividade ao estresse (Stroud et al., 2009; Dahl e Gunnar, 2009). Em diferentes culturas, adolescentes relatam passar por estresse diário na forma de pressões relativas ao passado recente ou do futuro próximo e pela família (Bynner, 2000),

escola (Arnett, 2002), colegas (Eccles et al., 1993; Hand e Furman, 2009) e relacionamentos afetivos (Kuttler e LaGreca, 2004).

O desenvolvimento do adolescente também está associado a alterações nas funções neuroendócrinas (Ojeda et al., 2009), inclusive no eixo HHA em resposta a estressores (McCormick et al., 2010; Romeo, 2010), podendo ser tanto de maior magnitude quanto de maior duração (Foilb et al., 2011), quando comparada à resposta em adultos (Goldman et al., 1973, Vazquez e Akil, 1993, , Romeo et al., 2006, Foilb et al., 2011).

Embora existam vários estudos apontando para efeitos de programação de estressores nos períodos neonatal (Charil et al., 2010), prenatal (McEwen, 2008) e infantil (Vrijnsen et al., 2014), os estudos visando entender os efeitos do estresse no cérebro adolescente ainda são recentes e escassos (Romeo e McEwen, 2006).

Atualmente, o uso do tabaco é a principal causa mundial de morte evitável, matando até metade de seus usuários. Essa prática mata cerca de 6 milhões de pessoas e causa prejuízos econômicos de centenas de bilhões de dólares em todo o mundo a cada ano. A maioria destas mortes ocorre em países de baixa e média renda, e esta disparidade deve aumentar ainda mais ao longo das próximas décadas.

Considerada o principal componente psicoativo do tabaco, a nicotina tornou-se uma droga universal; utilizá-la é considerado um hábito em diversos países. Anualmente no mundo, é consumida a fabulosa quantidade de 73 mil toneladas de nicotina contida em 7 trilhões e 300 bilhões de cigarros fumados por cerca de 1 bilhão e 300 milhões de tabagistas, dos quais 80% vivem nos países em desenvolvimento (OPS-BM, 2000; WHO, 2004).

A nicotina tem sido descrita como sendo um dos componentes ativos da fumaça do cigarro responsável por uma grande variedade de efeitos no sistema nervoso que resultam do consumo de tabaco (Benowitz, 1992; Dani e Heinemann, 1996). A nicotina induz tolerância e dependência pela ação nas vias dopaminérgicas centrais, levando às sensações de prazer e recompensa mediadas pelo sistema límbico. É um estimulante do sistema nervoso central (SNC), aumenta o estado de alerta e reduz o apetite. A diminuição de 50% no consumo da nicotina pode desencadear sintomas de abstinência nos indivíduos dependentes: ansiedade, irritabilidade, distúrbios do sono, aumento do apetite, alterações cognitivas e fissura pelo cigarro (Balbani e Montovani, 2005). Está estabelecido que a nicotina é neuroteratogênica, afetando o cérebro pela interferência em mecanismos de mitose e diferenciação, causando alterações na axonogênese e sinaptogênese e conseqüentemente comprometendo a atividade sináptica e comportamento (Slikker et al., 2005; Slotkin, 2002). Estudos indicam que ações da nicotina são responsáveis pelas bases farmacológicas do vício ao cigarro e a outras formas

de exposição ao tabaco (US Department of Health and Human Services, 1988; Royal College of Physicians, 2000).

A absorção da nicotina pelo corpo pode ser influenciada por sua concentração presente no tabaco, pela frequência e pela profundidade das tragadas. Análises em série das concentrações de nicotina no sangue de tabagistas revelam sua rápida elevação após a tragada, atingindo o pico máximo ao cabo de 5 a 10 minutos. A rápida taxa de absorção da nicotina e as grandes quantidades de nicotina que chegam ao cérebro pelo tabagismo são dois fatores cruciais na promoção e manutenção da dependência. A absorção da nicotina pelo organismo é de cerca de 1,0 mg por cigarro, variando de 0,34 mg a 1,56 mg (Benowitz, 1998).

Tem sido sugerido que adolescentes são particularmente sensíveis aos efeitos do tabaco. A maioria dos fumantes inicia o hábito na adolescência ou pré-adolescência (Nelson et al., 1995; Pierce E Gilpin 1996), fazendo com que a dependência ao tabaco seja frequentemente considerada uma “doença pediátrica” (Prokhorov et al., 2006; Abreu-Villaça et al., 2010). Estudos descrevem que mais de um terço dos estudantes adolescentes fumam (CDC 1998, 2000). No mundo inteiro, entre 82.000 e 99.000 jovens começam a fumar diariamente (Prokhorov et al, 2006). No Brasil, o Ministério da Saúde lançou a campanha "Viver bem é viver com saúde. Fique longe do cigarro". A ação celebra o Dia Nacional de Combate ao Fumo. Durante o evento realizado no Rio de Janeiro, foi lançada uma pesquisa a qual aponta que os adolescentes brasileiros não têm dificuldade para comprar cigarro, apesar de o país dispor da Lei Federal (n.º 8.069/1990) que proíbe a venda do produto para menores de idade. O percentual de meninas entre 13 e 15 anos que já comprou cigarro chega a 52,6% e a 48,1% entre meninos em algumas capitais do país (Ministério da saúde, 2011).

Começar a fumar durante a adolescência está associado à dependência química que se estende por longos períodos (Chen e Millar, 1998; National Institute on Drug Abuse, 1998; Nelson et al., 1995) e talvez mais importante, parte dos fumantes adolescentes apresentam sintomas de dependência antes mesmo de se tornarem fumantes diários, frequentemente somente com poucos dias de fumo ocasional (Di Franza et al., 2000, 2002a, 2002b; O'Loughlin et al., 2002). Isto sugere que o cérebro do adolescente é mais suscetível a dependência ao tabaco, em particular a substância nicotina, o que está de acordo com estudos que indicam que respostas a substâncias psicoativas são intrinsecamente diferentes durante este período do desenvolvimento (Leslie et al., 2004; Spear, 2000; Spear e Brake, 1983). Desta forma, adolescentes apresentam grande probabilidade de experimentar drogas de abuso, incluindo tabaco e etanol (Grant et al., 1987; Nelson et al., 1995; Webster et al., 1994), e

desenvolver vício quando comparados a indivíduos adultos (Maggs et al., 2008). Ao lado disto, parece existir uma forte correlação entre a idade inicial do uso da droga e a probabilidade de apresentar adição quando adulto (Di Franza e Guerrera, 1990), como também, o uso de uma droga na adolescência parece estimular o uso de diversas drogas de abuso durante o transcurso da vida (Kandel et al., 1992). Para múltiplas drogas de abuso, como o tabaco e o etanol, indivíduos que não iniciaram o uso durante a adolescência dificilmente iniciam o uso em idades posteriores (Chen e Kandel, 1995; Kandel e Logan, 1984).

Mais especificamente, a maturação dos sistemas colinérgicos do sistema nervoso central envolvidos em memória, aprendizado e respostas a psicoestimulantes, é consolidada durante o período da periadolescência (Leslie et al., 2004; Matthews et al., 1974; Nadler et al., 1974; Zahalka et al., 1993), sendo um importante aspecto deste período o fato da estimulação neuronal induzir rearranjo sináptico (Scheetz e Constantine-Paton, 1994), o que sugere que o cérebro do adolescente particularmente vulnerável a estimulantes do sistema nervoso central. Regiões neurais como o córtex pré-frontal e outras regiões de projeções dopaminérgicas do prosencéfalo, apresentam alterações proeminentes durante a adolescência. Dada a importância dessas regiões cerebrais na modulação de mecanismos de recompensa associados ao uso de drogas (Koob, 1992) e de respostas a agentes estressores (Dunn e Kramarcy, 1984) e a associação entre ambos (Goeders, 1997; Piazza et al., 1991), não é espantoso constatar que adolescentes respondem de formas diferentes a drogas de abuso, agentes estressores e a interação entre ambos, quando comparados com adultos ou mais maduros (Spear, 2002). Assim, adolescentes apresentam grande probabilidade de experimentar drogas de abuso (Grant et al., 1987; Nelson et al., 1995; Webster et al., 1994), e desenvolver vício quando comparados a indivíduos adultos (Maggs et al., 2008).

Estudos indicam uma alta associação entre tabagismo e transtornos associados ao estresse, como ansiedade (Lasser et al., 2000; Breslau et al., 1994; Lawrence et al., 2009) e depressão (Brown et al., 2000; Goodman e Capitman, 2000; Steuber e Danner, 2006). O tabagismo parece ser um fator predisponente para o aparecimento de transtornos de ansiedade (Breslau e Klein, 1999; Johnson et al. 2000), embora os transtornos de ansiedade não pareçam aumentar a incidência de tabagismo. Porém, a ocorrência de transtornos de ansiedade parece aumentar a propensão à dependência (Sonntag et al. 2000; Dierker et al. 2001; Johnson et al., 2000). Estudos indicam níveis de sintomas depressivos elevados em fumantes, em comparação a não-fumantes ou ex-fumantes (Benjet et al., 2004, Haukkala et al., 2000, Lam

et al., 2004, Lee Ridner et al., 2005, Luk e Tsoh, 2010, Martini et al., 2002). A direção da causalidade entre tabagismo e depressão ainda é incerta (Dierker et al., 2002). Embora vários estudos apontem para sintomas depressivos como fatores predisponentes para o tabagismo (Prinstein e La Greca, 2009; Repetto et al., 2005), outros também parecem indicar o tabagismo como fator de vulnerabilidade no desenvolvimento de sintomas depressivos (Steuber e Danner, 2006; Pasco et al., 2008).

A razão pelo qual o tabagismo leva a transtornos psiquiátricos no futuro ainda não é totalmente clara. Um dos elementos importantes do tabagismo como agente estressor é a sua capacidade aditiva, uma vez que indivíduos que tentaram parar de fumar sem sucesso apresentam altos níveis de estresse (Sung et al., 2011; van der Deen et al., 2011). Outro elemento do tabagismo como agente estressor tem sido associado ao efeito ansiolítico agudo da nicotina, que de algum modo pode atrapalhar o desenvolvimento de estratégias adaptativas importantes para lidar com agentes estressores futuros (Koval e Peterson, 1999; McGee et al., 2013). Sabe-se que o tabagismo, a curto e longo prazo, afeta a liberação de ACTH e cortisol, sendo esse efeito proporcional ao conteúdo de nicotina no cigarro, o número de cigarros fumados e o intervalo entre cada cigarro fumado (Kirschbaum et al., 1992; Mendelson et al., 2005; Steptoe e Ussher, 2006). Há uma grande quantidade de estudos mostrando níveis de cortisol elevados em fumantes, em comparação com não fumantes (Steptoe e Ussher, 2006; Wilkins et al., 1982). Estudos recentes também mostram efeitos do fumo de cigarros em um aumento da secreção de ACTH. Aparentemente, cigarros com um baixo conteúdo total de nicotina não leva a elevações significantes de ACTH circulante, mas cigarros com altas concentrações de nicotina o fazem com um aumento considerável (Mendelson et al., 2005, 2008). Esses efeitos são, em grande parte, atribuídos à nicotina, que exerce seus efeitos no eixo HHA ao induzir a liberação de CRH ao se ligar a receptores nicotínicos colinérgicos presentes no locus ceruleus e no hipotálamo (Fuxe et al., 1989, Matta et al., 1998; Rosencrans e Karin, 1998), o que conseqüentemente leva a um aumento nos níveis de ACTH e cortisol séricos, de maneira dose-dependente (Mendelson et al., 2005; Newhouse et al., 1990).

É bem conhecido que os sistemas neurais que respondem ao estresse têm importante papel no início e manutenção do tabagismo (Koob, 2008). Fumantes apontam o alívio do estresse como motivação principal para o tabagismo (Ikard et al., 1969). Em estudos recentes, fumantes declararam fumar para alívio do estresse, assim como pelo prazer de fumar (Fidler e West, 2009; McEwen et al., 2008;) Além disso, fumantes frequentemente declaram não quererem interromper o hábito de fumar pois veem neste uma forma melhor de lidar com o estresse de seu cotidiano. (Lader, 2007). Apesar disso, estudos apontam para o tabagismo

como responsável por aumentar os níveis subjetivos de estresse, e muitas vezes o ato de fumar seria somente uma maneira de aliviar o estresse causado por ele mesmo (Parrott, 1994, 1995, 1999). Da mesma forma, estudos mostram que exposição a estressores aumenta o desejo de fumar em tabagistas (Perkins e Grobe, 1992; Cherek, 1985; Rose et al., 1983) e reaquisição de auto-administração de nicotina em modelos animais (Yu et al., 2014). Estressores de mais larga escala, como o ataque às torres gêmeas de 11 de setembro e os sobreviventes do furacão Katrina, também estão associados com um aumento do tabagismo na população local (Vlahov et al., 2004a,b; Flory et al., 2009)

Apesar de haver estudos em modelos animais experimentais avaliando a exposição de nicotina em modelos de adolescência em parâmetros de comportamentos associados a estresse, como ansiedade (Hamilton et al., 2010) e depressão (Ribeiro-Carvalho et al., 2011; Iñiguez et al., 2009), não existem estudos em neurobiologia básica que avalie as possíveis interações entre nicotina e estresse nesta idade em futuras alterações nas respostas emocionais.

## 1 OBJETIVOS<sup>1</sup>

### 1.1 Geral

O presente estudo tem como objetivo fornecer dados para elucidar os efeitos centrais imediatos e tardios da exposição concomitante de drogas de abuso e estresse psicológico durante a adolescência, uma fase de especial sensibilidade a efeitos deletérios no desenvolvimento do sistema nervoso central.

### 1.1 Específicos

Nesse trabalho avaliamos os efeitos da exposição concomitantemente à nicotina e estresse psicológico durante a adolescência de camundongos sobre comportamentos análogos à parâmetros de relevância psiquiátrica: ansiedade, comportamento social e comportamento tipo depressivo. Esses parâmetros foram avaliados em três diferentes momentos: ao final da exposição, após um curto período de retirada e, para avaliar os efeitos persistentes e/ou de longo prazo, durante a idade adulta.

Considerando que têm sido demonstradas diferenças entre machos e fêmeas para os efeitos do estresse e da nicotina na função cerebral (Abreu-Villaça et al., 2008; Ribeiro-Carvalho et., 2011; Hong et al., 2012), também consideramos neste trabalho o sexo como fator.

---



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Este é um projeto de dissertação de natureza experimental sendo integralmente desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Todos os experimentos descritos aqui foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG / UERJ e estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelo Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health* - NIH) dos Estados Unidos da América.

### 2.1 Modelo experimental

Para este estudo foram utilizados camundongos da cepa Suíço (151 machos e 171 fêmeas), provenientes de 39 ninhadas. Os animais foram criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro num ciclo diário de 12 horas claro/escuro (escuro a partir de 13 h), temperatura controlada e mantida em torno de 21° C, com livre acesso à água e comida.

Os animais progenitores foram organizados em caixas com um macho e múltiplas (de duas a três) fêmeas. Assim que a gravidez era verificada, a fêmea era individualizada e acompanhada diariamente para determinação do dia do nascimento. A data de nascimento foi considerada como primeiro dia Pós Natal (PN1). Para este estudo foram utilizadas apenas ninhadas com 8 a 12 animais. Ao completarem 21 dias de vida pós-natal (PN21), os animais eram desmamados e separados por sexo; os irmãos do mesmo sexo permaneceram juntos até PN30. Em PN30, os animais de mesmo sexo eram alocados em duplas. A decisão de não realizar a individualização dos animais se deve ao fato de que várias evidências demonstram que o isolamento social é um fator gerador de estresse (Lapiz et al., 2003) e, desta forma, poderia interagir com as variáveis do presente estudo. Após a separação dos animais, deu-se início a exposição à nicotina e/ou estresse por contenção. Em roedores, o período de PN30 a PN40 corresponde à idade aproximada durante a qual animais de ambos os gêneros passam a exibir características comportamentais típicas e fenômenos neuroquímicos e endócrinos

particulares da adolescência (Eiland e Romeo, 2013). Sendo assim, a exposição ao estresse se deu de PN30 a PN40 (com exceção do grupo testado em PN40, que foi estressado somente até PN38), sendo interrompido para a realização dos testes comportamentais. Já a exposição à nicotina na água de beber ocorreu de PN30 a PN40, incluindo o período de realização dos testes comportamentais realizados ao final do período de exposição. A avaliação comportamental foi realizada ao final do período de exposição (PN39/40), após curto período de retirada (PN44/45) e após longo período de retirada na vida adulta (PN69/70).

Todos os animais experimentais foram submetidos aos seguintes testes neurocomportamentais, na respectiva ordem: 1) Em PN39, 44 ou 69, na fase clara (entre 10h e 13h), os animais foram testados no teste do labirinto em cruz elevada. 2) Em PN40, PN45 ou PN70, na fase clara (entre 10h e 13h), os animais foram submetidos ao teste de abordagem social de três câmaras. 3) Em PN40, PN45 ou PN70, na fase escura foram submetidos ao teste do nado forçado (entre 13h e 16h).

## 2.2 Formação dos grupos experimentais

Para o estudo do impacto da exposição ao estresse e/ou a nicotina durante a adolescência, foram utilizados quatro grupos experimentais:

- a) **Estresse+Nicotina** (estresse por contenção + solução contendo nicotina e sacarina; NIC+ST). Animais expostos ao estresse por contenção e que ingeriam uma solução de nicotina (50ug/ml) contendo sacarina.
- b) **Estresse** (estresse por contenção + solução composta de sacarina diluída em água; ST). Animais expostos ao estresse por contenção e que ingeriam água contendo sacarina.
- c) **Nicotina** (ausência de estresse por contenção + solução contendo nicotina e sacarina; NIC). Animais que não foram submetidos ao estresse por contenção e que ingeriam uma solução de nicotina (50ug/ml) contendo sacarina.
- d) **Controle** (ausência de estresse por contenção + solução composta de sacarina diluída em água; CONT)

Desta forma, com este desenho, somos capazes de detectar os efeitos da nicotina, do estresse, e da dupla exposição.

### 2.2.1 Exposição ao estresse por contenção

O estresse por contenção tem sido um dos mais comumente modelos de indução de estresse em roedores (Jaggi et al., 2011). Durante o período de exposição, após a pesagem dos animais, os animais do grupo Estresse e Estresse+Nicotina eram posicionados em cilindros de 3cm x 11cm, com orifícios para passagem de ar, por uma hora. Após uma hora de exposição ao estresse por contenção, os animais eram alocados de volta em suas caixas, voltavam para o biotério e recebiam as pipetas recém-preenchidas com solução de sacarina ou sacarina+nicotina. Os animais Controle e Nicotina voltavam ao biotério após a pesagem.

Figura 1 - Fotografia do tubo Falcon adaptado para a exposição ao estresse por contenção



### 2.2.2 Exposição a nicotina por via oral

No primeiro dia de exposição, os camundongos adolescentes tiveram as suas garrafas de água retiradas e os animais Nicotina e Estresse+Nicotina passaram a ter acesso a pipetas volumétricas preenchidas com uma solução contendo nicotina (50µg/mL - Sigma, St Louis, MO) diluída em água potável (única fonte de água). A fim de mascarar o gosto amargo da nicotina, a solução também continha sacarina a 2%. Os animais Controle e Estresse tinham acesso a pipetas contendo uma solução de água potável contendo a mesma concentração de sacarina. No momento da pesagem, para a quantificação da ingestão das soluções, as pipetas eram retiradas para esvaziamento do conteúdo e preenchimento com soluções novas, sendo então devolvidas aos animais após o período de uma hora da exposição ao estresse por contenção. Este modelo de administração de nicotina foi utilizado pois a ingestão de nicotina ocorrerá de forma *ad libitum*, padrão semelhante ao consumo de nicotina por humanos tabagistas.

Figura 2 – Fotografia das pipetas volumétricas utilizadas para administração das soluções de nicotina+sacarina e sacarina



### 2.3 Ingestão de líquido, massa corporal e consumo de nicotina

A ingestão de líquido e a massa corporal dos animais foi medida diariamente durante o período de exposição. A razão entre a ingestão e o peso do animal (ingestão/massa corporal) foi calculada para todos os grupos de tratamento a fim de detectar possíveis alterações na ingestão de solução em relação ao peso do animal durante o período de tratamento. Para os grupos expostos à nicotina foi quantificado o consumo diário de nicotina (mg/kg). O consumo diário de solução foi multiplicado pela dose de nicotina (nicotina *free base*; 50µg/ml) para ser dividido pela massa corporal correspondente ao dia da ingestão, sendo assim, temos:

$$NICOTINA = \frac{DOSE \times INGEST\tilde{A}O_{DIAi}}{MASSA_{DIAi}}$$

Sendo:

NICOTINA<sub>DIAi</sub>: consumo de nicotina (em µg/g ou em mg/Kg) no dia i;

DOSE: 50µg de nicotina / ml de sacarina a 2%;

INGEST\tilde{A}O<sub>DIAi</sub>: volume (em ml) de solução ingerido no dia i

MASSA<sub>DIAi</sub>: massa corporal do animal (em g) no dia i

### 2.4 Testes comportamentais

Os animais foram submetidos aos testes comportamentais ao final do período de exposição (PN39 e PN40), durante o período de curto prazo após o término da exposição (PN44 e PN45) ou durante o período de longo prazo após o término da exposição (PN69 e PN70). Os testes foram realizados numa sala com proteção acústica e gravados em uma câmara de vídeo digital para posterior análise.

A fim de diminuir situações de estresse que pudessem interferir no resultado do experimento, o horário para a realização do teste comportamental, bem como o local de realização destes, foram os mesmos utilizados nas idades estudadas e os animais eram

ambientados na sala de testes por no mínimo 30 minutos antes do início de cada teste comportamental.

#### 2.4.1 Labirinto em cruz elevado

O teste de labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos mais populares testes em uso atualmente dentre os testes comportamentais utilizados para quantificar os níveis de ansiedade em animais experimentais (Carobrez e Bertoglio, 2005). O LCE foi validado para uso em espécies como ratos (Pellow et al., 1985) e camundongos (Lister, 1987). As expressões comportamentais observadas no teste LCE representam uma combinação de comportamentos exploratórios e de esquiva, assim como de atividade geral (File, 2001). O LCE consiste em um aparelho de acrílico pintado de cinza constituído de 4 braços - 2 abertos (BA) e 2 fechados (BF) - dispostos em forma de cruz e elevado 50 cm do chão. As medidas do aparelho são: braços abertos com 5 cm de largura e 29 cm de comprimento sem paredes e braços fechados com 5 cm de largura, 29 cm de comprimento e 15 cm de altura.

Figura 3 - Fotografia em vista superior do labirinto em cruz elevado



Legenda: Os braços na horizontal são denominados braços fechados (BF) e os braços na vertical, braços abertos (BA)

Antes do início de cada teste, as caixas dos animais foram transportadas para a sala de teste onde os animais foram ambientados por 30 minutos. Para realização dos testes, os animais foram colocados sempre na interseção entre os braços, com a cabeça na direção de um dos braços fechados. A duração do teste foi de 10 minutos. Após o término de cada teste, o labirinto era limpo com um papel umedecido com água com o intuito de eliminar excretas e minimizar odores que pudessem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados. Os testes foram realizados na fase clara, numa sala com proteção acústica e gravados por uma câmera de vídeo posicionada acima do labirinto para análise posterior.

Foram utilizadas como variáveis de estudo: o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, assim como, o número de entradas nos braços abertos e braços fechados. Para esta avaliação foi utilizado o programa ACC PlusM 102 Avaliação Computadorizada de

Comportamento (desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia/DCF/IBRAG/UERJ). A partir destas medidas, foram quantificados o percentual de tempo nos braços abertos, percentual de entradas nos braços abertos e o percentual de tempo no centro do aparelho. O tempo de permanência, o percentual de tempo nos braços abertos, o número e o percentual de entradas nos braços abertos foram utilizados como medidas de ansiedade (Lal et al., 1991; Pellow et al., 1985). A soma do número de entradas nos braços fechados foi utilizada como medida de atividade geral (Cruz et al., 1994; Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1995; Rodgers e Dalvi, 1997).

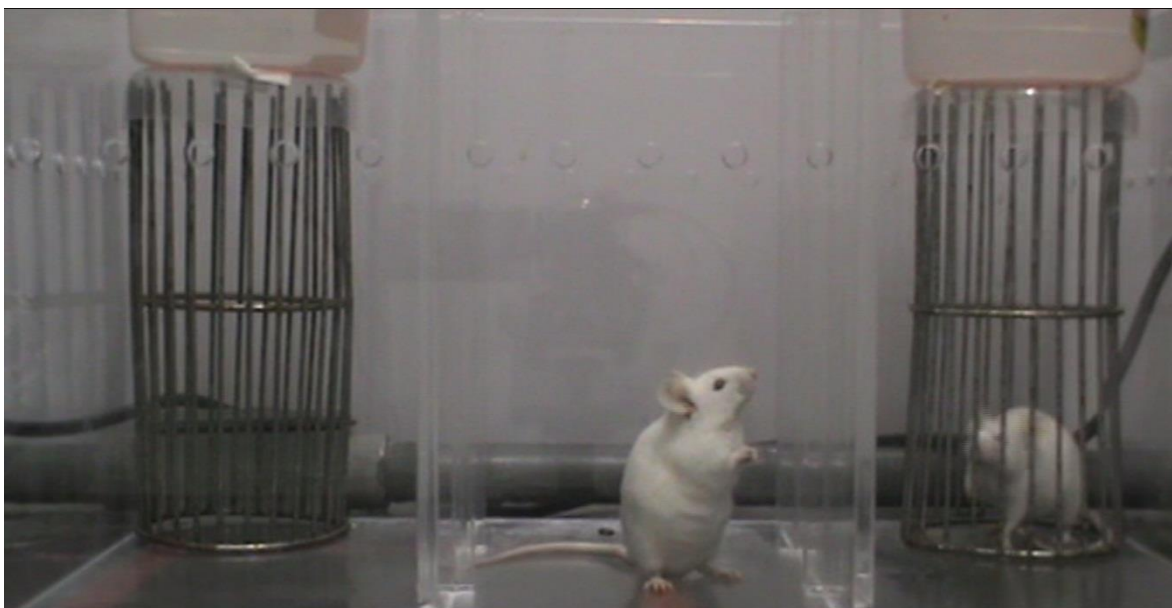
#### 2.4.2 Teste social de três câmaras

O teste social de três câmaras (TS), também conhecido como *Crawley's sociability test*, tem sido empregado com sucesso para estudar sociabilidade em roedores (Kaidanovich-Beilin et al., 2011). O princípio deste teste baseia-se na livre escolha de um roedor a passar o tempo em qualquer um dos três compartimentos da caixa durante a sessão experimental, onde em um dos compartimentos laterais este poderá realizar contato indireto com um animal não-familiar.

O aparelho do TS consiste de uma caixa de acrílico transparente (20 cm x 22,5 cm x 40cm), dividida em três câmaras de tamanhos iguais, separadas por duas portas de correr. Em ambas as câmaras laterais, são posicionadas grades (raio = 8,5cm, altura = 17cm) confeccionadas para a contenção de camundongos. No momento do teste, uma das câmaras tem a grade vazia enquanto a outra tem a grade contendo um camundongo, previamente habituado a interação com outros animais no contexto do teste, de mesmo sexo do camundongo testado. Após o período de 30 minutos de habituação na sala de testes, o camundongo a ser testado era posicionado na câmara central do aparelho. Após cinco minutos de permanência na câmara central, as portas de correr eram puxadas e o camundongo tinha livre acesso as câmaras laterais. As imagens foram gravadas por uma câmera de vídeo posicionada de frente para o aparelho para análise posterior. As variáveis quantificadas foram: percentual de tempo de permanência na câmara contendo o animal não-familiar, percentual de entradas na câmara contendo o animal não-familiar e o percentual de interações com a grade que continha o animal não-familiar.



Figura 4 - Fotografia do teste de sociabilidade. Na câmara do centro está localizado o animal a ser avaliado. Posicionado dentro da grade direita está o animal não-familiar

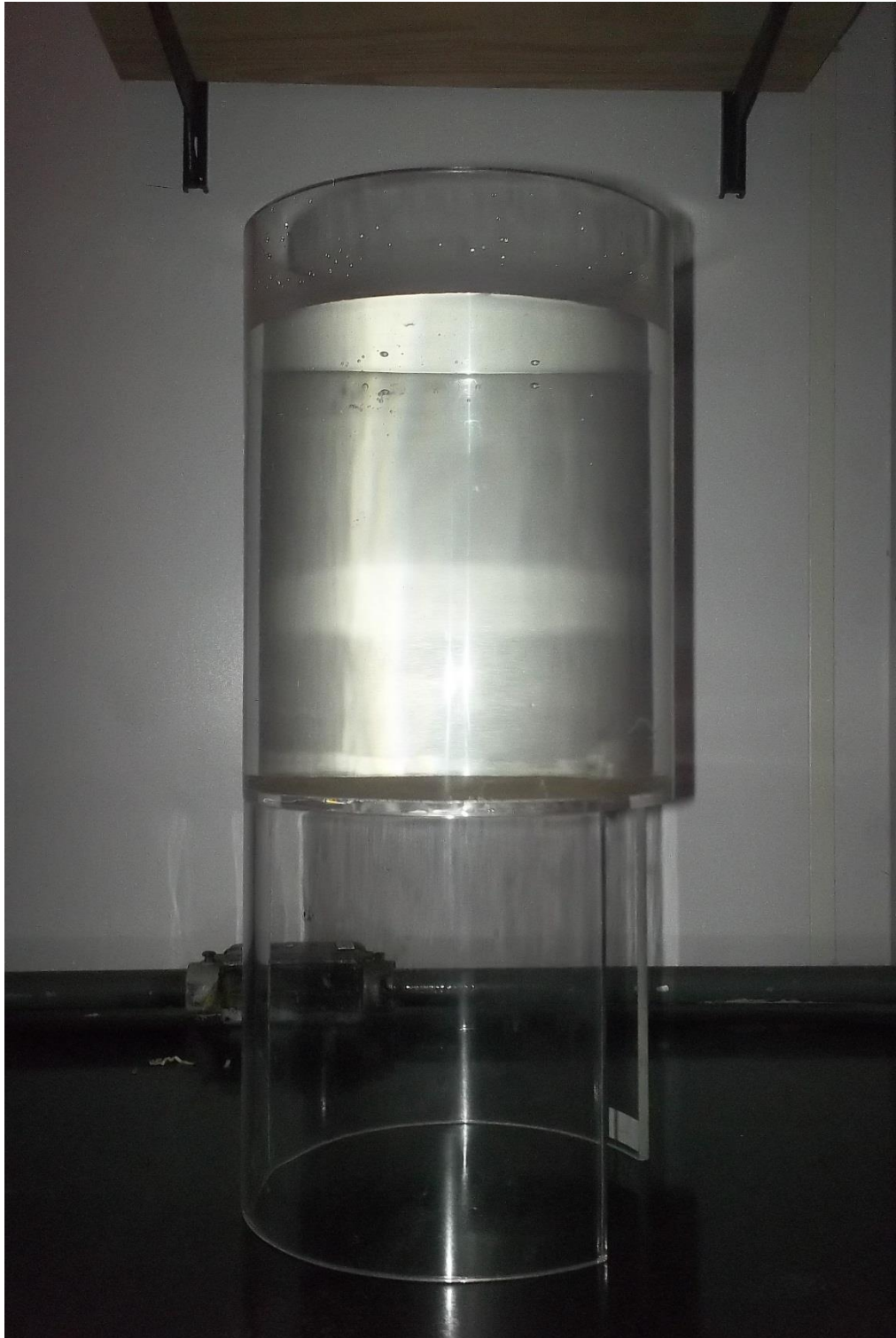


#### 2.4.3 Nado forçado

O teste do nado forçado (FST) é o teste mais utilizado para se estudar comportamento tipo depressivo em roedores (Bogdanova et al., 2013). No presente trabalho usamos um teste modificado do original, onde cada animal foi submetido a uma sessão de 6 minutos de nado forçado. O procedimento do teste é descrito em detalhes em Filgueiras *et al.* (2006). Neste teste, cada camundongo foi colocado em um recipiente de plástico (diâmetro = 19cm, altura = 25cm) preenchido com água (altura da coluna d'água = 20 cm) a uma temperatura de aproximadamente 25°C. O comportamento do animal foi continuamente registrado ao longo da sessão através de uma câmera de vídeo.

Foi avaliada no teste do nado forçada a imobilidade (*immobility*), que representa o tempo que os animais permaneciam flutuando com as patas e a cauda imóveis com a exceção de pequenos movimentos posturais necessários à manutenção da cabeça do animal fora da água. A medida de imobilidade foi utilizada como medida de comportamento associado à depressão.

Figura 5 - Fotografia com visão lateral do recipiente preenchido com água utilizado para a realização do teste do nado forçado



## 2.5 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como médias e erros padrão da média.

### 2.5.1 Análise da massa corporal e ingestão de líquidos

A análise da massa corporal e ingestão de líquido foi realizada através da Análise de Variância com medidas repetidas (ANOVA<sub>r</sub>) para as variáveis: massa corporal, ingestão absoluta e ingestão corrigida (ingestão/massa corporal). O dia da medição foi considerado fator de repetição. TRATAMENTO (CONTROLE, ESTRESSE, NICOTINA e NICOTINA+ESTRESSE) e SEXO foram considerados fatores. ANOVAs de menor ordem foram utilizadas sempre que houve interação entre TRATAMENTO e outros fatores. Diferenças entre grupos individuais foram submetidas à análise post-hoc pelo teste *Fisher's Protected Least Significant Difference* (FPLSD, em português, Teste Protegido de Fisher de Menor Diferença Significativa).

### 2.5.2 Análise comportamental (LCE, TS e FST)

Para reduzir a probabilidade de erro estatístico do tipo 1, que pode resultar de testes repetidos, os resultados foram analisados inicialmente usando uma ANOVA global para todos os fatores (TRATAMENTO de nicotina e/ou estresse, IDADE e SEXO). ANOVAs de menor ordem foram utilizadas toda vez que interações de TRATAMENTO com outros fatores foram detectadas. Essas determinações foram feitas antes de ser decidido se haveria separação por sexo dentro de cada grupo de tratamento. Diferenças entre grupos individuais ou diferenças entre as idades foram analisadas utilizando FPLSD (Fisher Protected Least Significant Difference) como teste post-hoc. O valor de significância assumido foi de  $p < 0,05$  para o efeito do tratamento e  $p < 0,1$  para interações. Foi avaliado também se efeitos do TRATAMENTO detectados em ANOVAs de menor ordem eram mantidos após a subdivisão dos fatores de interação (Snedecor e Cochran, 1967).

O desenho do estudo requereu duas formas diferentes de análise do efeito do tratamento com nicotina e/ou estresse. Para comparar os quatro grupos tratados (CONTROLE, NICOTINA, ESTRESSE, NICOTINA+ESTRESSE) entre si, uma análise unidimensional com o fator TRATAMENTO foi utilizada. Para determinar se a nicotina interfere com os efeitos do estresse ou vice versa, ou seja, se há interação entre os efeitos da exposição à nicotina e estresse, uma análise bidimensional foi utilizada com um fator correspondendo ao tratamento com nicotina (NICOTINA) e o outro correspondendo ao tratamento com estresse (ESTRESSE). Neste formato, efeitos mais-que-aditivos (sinergistas) e menos-que-aditivos aparecem como interações significativas entre as duas dimensões de tratamento (NICOTINA×ESTRESSE), enquanto que efeitos aditivos não apresentam interações significativas (Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009; Abreu-Villaça et al, 2004a, 2004b, 2007).

### 3 RESULTADOS

A partir das análises estatísticas obtivemos os resultados a serem analisados.

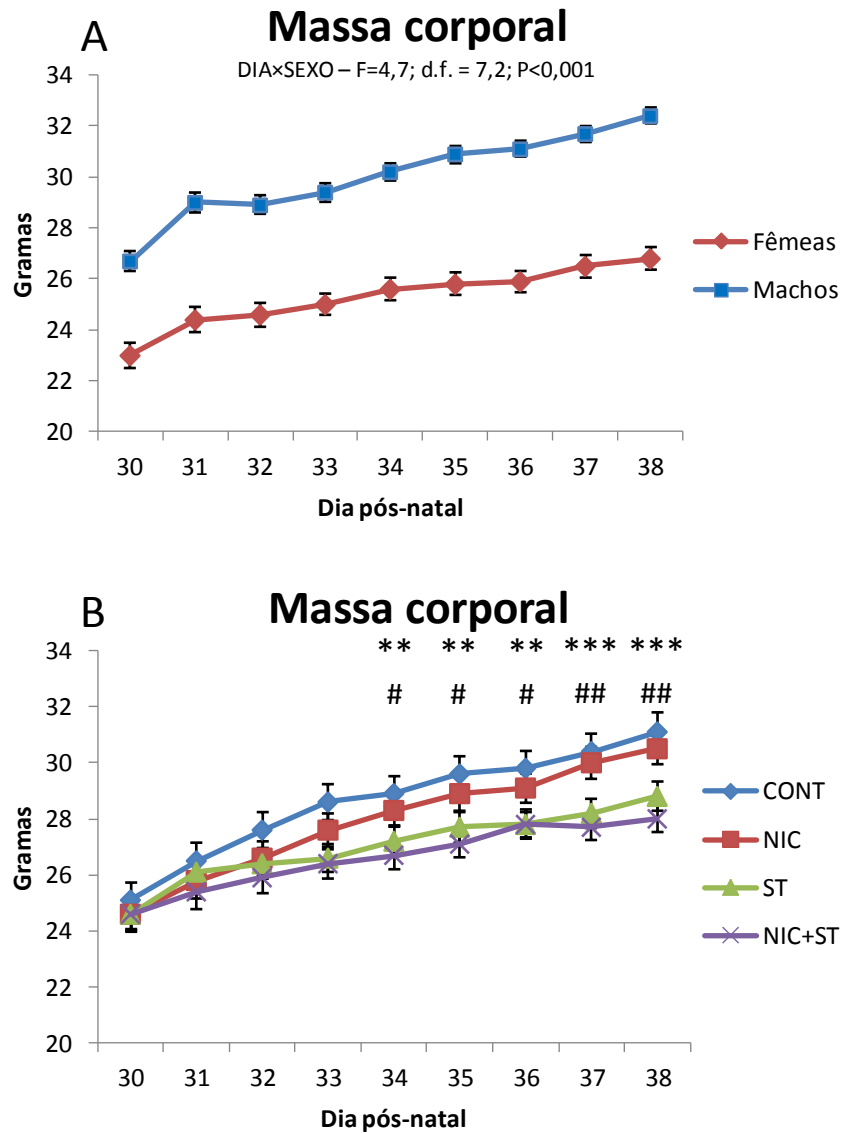
#### 3.1 Massa corporal e ingestão de líquidos

A ANOVAr indicou que a massa corporal aumentou durante o período de exposição (efeito do DIA:  $F = 261$  ; d.f. = 3,6 ;  $P < 0,001$ ). Este aumento foi mais intenso em machos que em fêmeas (Gráfico 1 A - interação DIA×SEXO –  $F=4,7$ ; d.f. = 7,2;  $P < 0,001$ ). Além disso, foi observado que o ganho de massa corporal não ocorreu igualmente entre os grupos experimentais (interação DIA×GRUPO -  $F = 5,2$ ; d.f. = 10,9;  $P < 0,001$ ). Os animais expostos ao estresse apresentaram menor ganho de massa corporal, sendo as diferenças significativas quando comparados ao grupo controle a partir de PN34 (Gráfico 1 B).

Em relação à ingestão de líquido, a ANOVAr apenas indicou efeito do DIA (  $F=6,1$ ; d.f. = 5,5;  $P < 0,001$ ). Esse efeito pode ser explicado pela relativa redução do consumo ao longo do período de exposição (Gráfico 1 A). Apesar da ausência de interações na ANOVAr, observamos um consumo de líquido diminuído ao longo do período de exposição nos grupos que receberam solução de nicotina (ANOVA-  $F = 21,7$ , d.f. = 3;  $P < 0,001$ ), onde o grupo NIC apresentou uma redução de aproximadamente 19% quando comparado ao controle e o grupo NIC+ST apresentou uma redução de aproximadamente 25% ( $P < 0,001$  em ambos; Gráfico 2 B).

Não foram observadas diferenças no consumo de nicotina entre grupos expostos (Tabela 1).

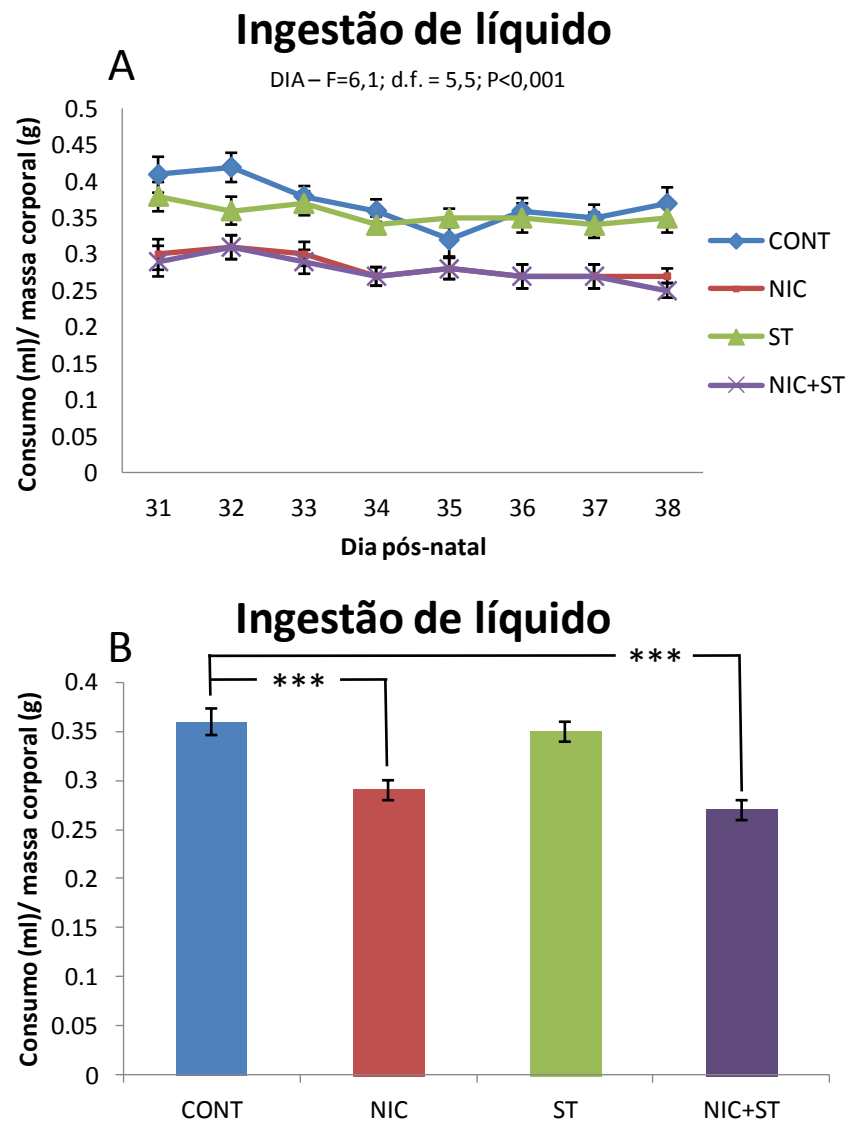
Gráficos 1 – Ganho de massa corporal ao longo do tratamento



Legenda: a) Comparação entre machos e fêmeas no ganho de massa corporal ao longo da exposição. Ambos os sexos aumentaram de massa corporal ao longo do tratamento, tendo os machos apresentado um ganho de massa corporal maior que as fêmeas. b) Comparação entre os grupos experimentais no ganho de massa corporal ao longo da exposição.

Nota: Os animais que passaram pelo protocolo de estresse mostram uma diminuição no ganho de massa corporal em comparação aos que não passaram. \*para comparações entre CONT e NIC+ST e # para comparações entre CONT e ST; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; #P<0,05; ##P<0,01.

Gráficos 2 – Ingestão de líquido ao longo do tratamento



Nota: a) Valores de ingestão de líquido corrigidos pela massa corporal ao longo dos dias. b) Valores totais de ingestão de líquido corrigidos pela massa corporal.

Legenda: A exposição à nicotina diluída em água levou a um menor consumo da solução em relação ao grupo controle. No grupo NIC a diminuição foi de 19% ( $p < 0,001$ ), e no grupo NIC+ST a diminuição 25% do consumo de nicotina ( $p < 0,001$ ). \*\*\*  $P < 0,001$

Tabela 1 - Consumo médio diário de nicotina

<b>Grupo</b>	<b>Consumo médio de nicotina</b>
<b>NIC</b>	14,5±0.4
<b>ST+NIC</b>	13,7±0.3

(valores apresentados em  $\mu\text{g}$  de nicotina/g de massa corporal por dia)

### **3.2 Avaliação comportamental**

Os resultados a seguir foram obtidos a partir dos protocolos explicitados no tópico 2.4 desse texto.

#### **3.2.1 Labirinto em cruz elevado**

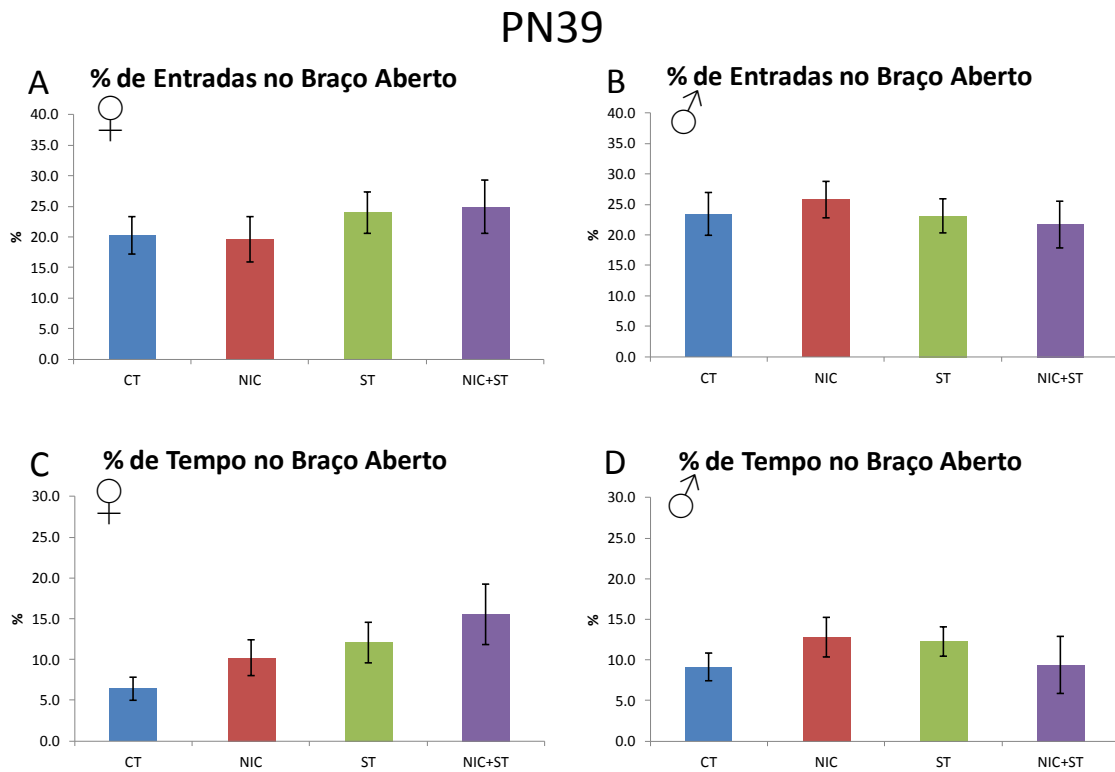
Os dados a seguir foram obtidos a partir do labirinto em cruz elevado.

##### **3.2.1.1 Labirinto em cruz elevado ao final do período de exposição (PN39)**

A ANOVA não indicou efeito do TRATAMENTO, assim como não foi verificada interação entre TRATAMENTO e SEXO para as variáveis associadas a ansiedade (Gráficos 3).



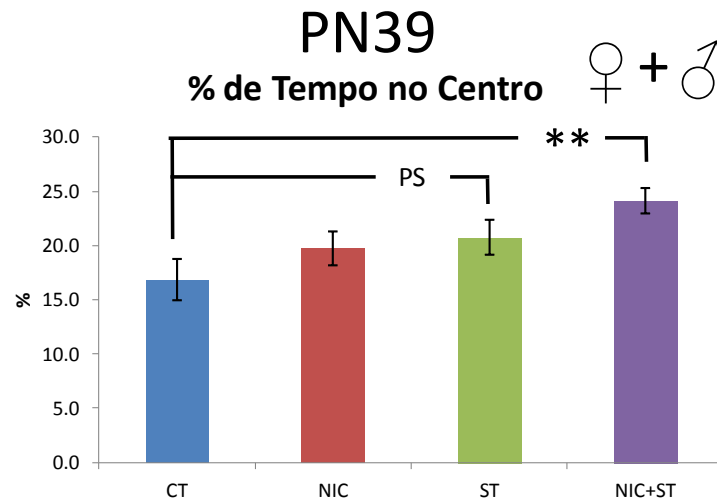
Gráficos 3 – Parâmetros de ansiedade em PN39



Legenda: Percentual de entradas (gráficos A e B) e de permanência (gráficos C e D) nos braços abertos em PN39  
 Nota: a) Percentual de entradas nos braços abertos em fêmeas. b) Percentual de entradas nos braços abertos em machos. c) Percentual de permanência nos braços abertos em fêmeas. d) Percentual de permanência nos braços abertos em machos. Em PN39, não houve diferenças significativas entre os grupos nos parâmetros de ansiedade avaliados. A análise bidimensional não indicou interações significativas entre as exposições a nicotina e estresse no grupo NIC+ST.

Para o percentual de tempo no centro, a ANOVA indicou efeito do TRATAMENTO ( $F = 2,8$ ; d.f. = 3;  $P < 0,05$ ), mas não houve interação com SEXO. Este efeito pode ser explicado por ambos machos e fêmeas do grupo da exposição combinada NIC+ST apresentarem maior percentual de tempo no centro quando comparados com seus respectivos controles ( $P < 0,01$ , Gráfico 4). Animais submetidos somente ao modelo de estresse também apresentaram aumento, mas este não atingiu significância estatística ( $P = 0,08$ ). A análise bidimensional não indicou interações significativas entre exposição à nicotina e ao estresse, demonstrando que as alterações no tempo no centro refletem um efeito aditivo da nicotina e do estresse.

Gráfico 4 – Parâmetros de tomada de decisão PN39

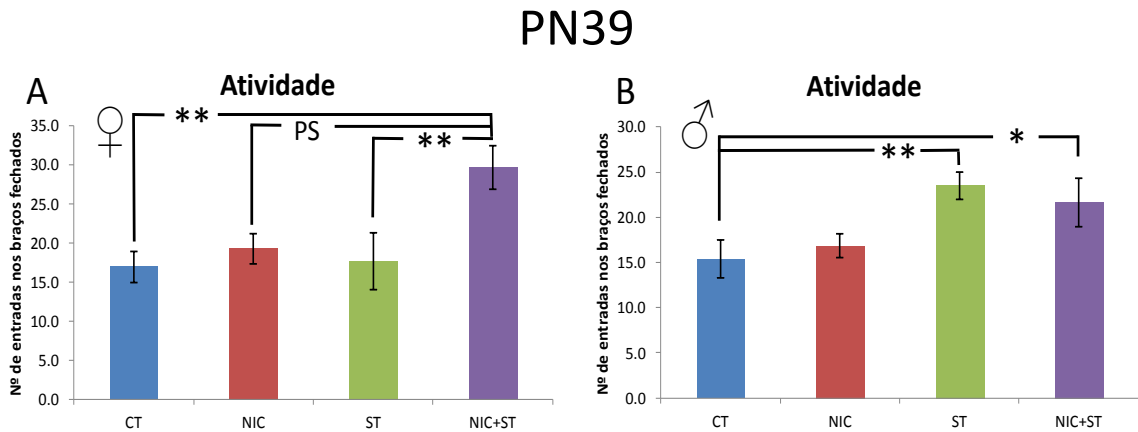


Nota: Tempo, em percentual, de permanência no centro do labirinto em cruz elevado em PN39

Legenda: Em PN39, animais expostos a nicotina e estresse apresentaram um maior tempo de permanência no centro do aparelho ( $p < 0,01$ ). Animais expostos somente a estresse também aparentam um aumento do tempo de permanência no centro, mas o valor de prova não atingiu significância estatística ( $P = 0,08$ ). PS = próximo de significativo; \*\*  $P < 0,01$

A ANOVA indicou efeitos diferentes para machos e fêmeas para a medida de atividade motora. Em fêmeas ( $F = 3,9$ ; d.f. = 3,  $P < 0,05$ ), o grupo da exposição combinada apresentou hiperatividade ( $NIC+ST > CT$ ,  $P < 0,01$ , Gráfico 5A). Já em machos, em ambos os grupos submetidos ao estresse foi observada a hiperatividade ( $ST > CT$ ,  $P < 0,01$  e  $NIC+ST > CT$ ,  $P < 0,05$ ; Gráfico 5B). A análise bidimensional indicou efeito aditivo entre a exposição à nicotina e ao estresse.

Gráficos 5 – Parâmetros de atividade locomotora em PN39



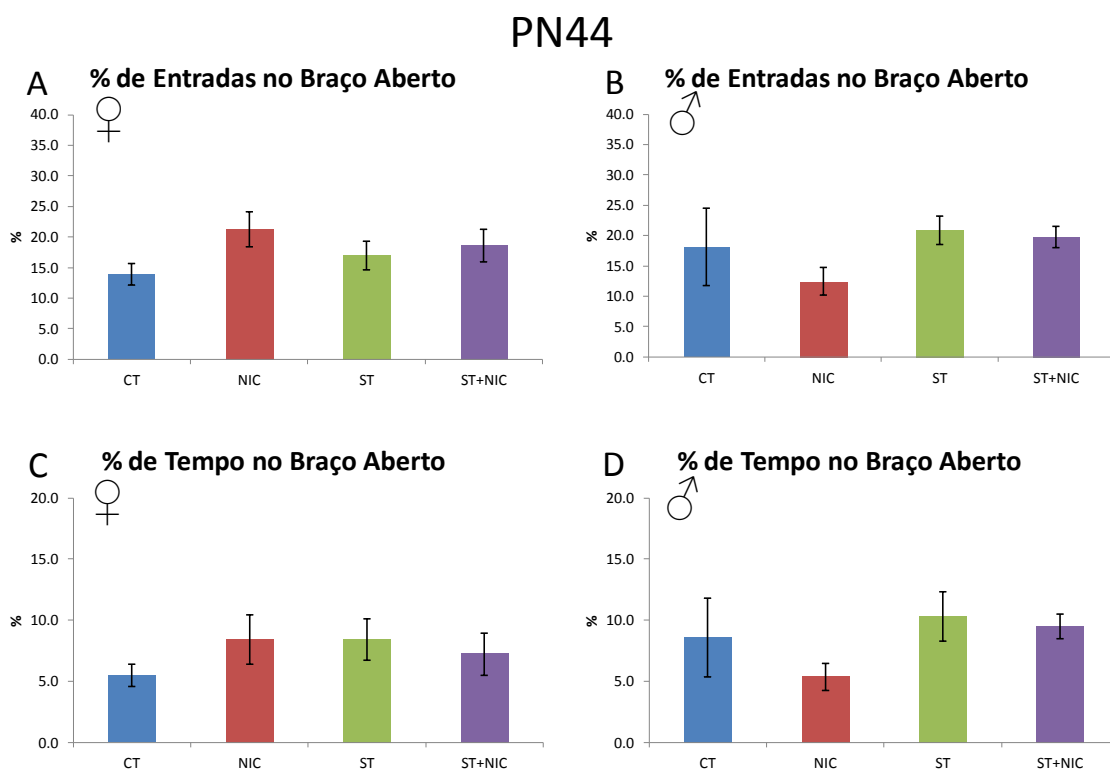
Legenda: a) Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado em fêmeas. b) Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado em machos.

Nota: Fêmeas expostas a nicotina e estresse apresentaram um aumento de permanência nos braços fechados. Machos expostos a estresse apresentaram um maior número de entradas nos braços fechados em relação ao grupo controle. A análise bidimensional indicou efeito aditivo entre a exposição à nicotina e ao estresse. PS = próximo de significativo; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

### 3.2.1.2 Labirinto em cruz elevado após um curto período de retirada (PN44)

Da mesma forma do ocorrido ao final da exposição, a ANOVA não indicou efeito do TRATAMENTO, como também não foi verificada interação entre TRATAMENTO e SEXO para as variáveis associadas à ansiedade (Gráficos 6).

## Gráficos 6 – Parâmetros de ansiedade em PN44

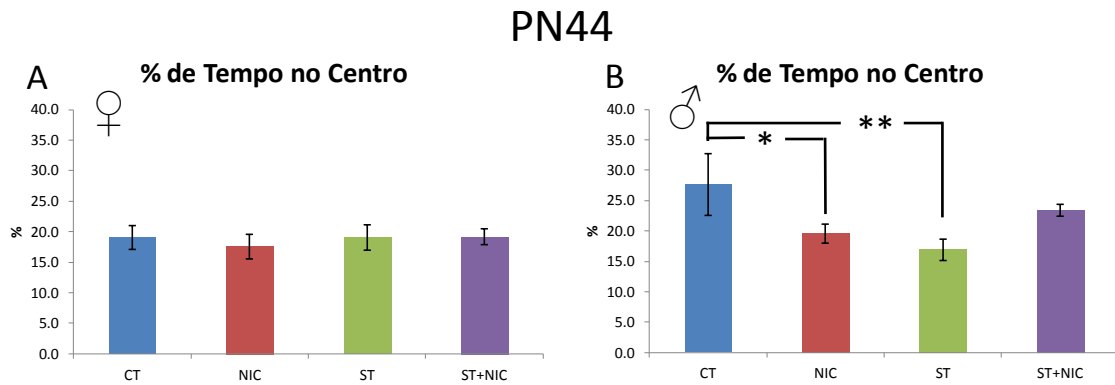


Legenda: a) Percentual de entradas nos braços abertos em fêmeas. b) Percentual de entradas nos braços abertos em machos. c) Percentual de permanência nos braços abertos em fêmeas. d) Percentual de permanência nos braços abertos em machos.

Nota: Em PN44, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para as variáveis associadas à ansiedade analisadas.

Para o percentual de tempo no centro, a ANOVA indicou efeito do TRATAMENTO significativo apenas em machos ( $F = 3,5$ , d.f. = 3,  $P < 0,05$ ). Machos do grupo nicotina e do grupo estresse apresentaram redução do tempo no centro ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente; Gráficos 7). A exposição combinada reverteu esse efeito, como indicado pela interação entre os fatores estresse e nicotina na ANOVA bidimensional ( $F = 9,7$ , d.f. = 1,  $P < 0,01$ ), desta forma, verificamos no caso um efeito menos que aditivo.

## Gráficos 7 - Parâmetros de tomada de decisão em PN44

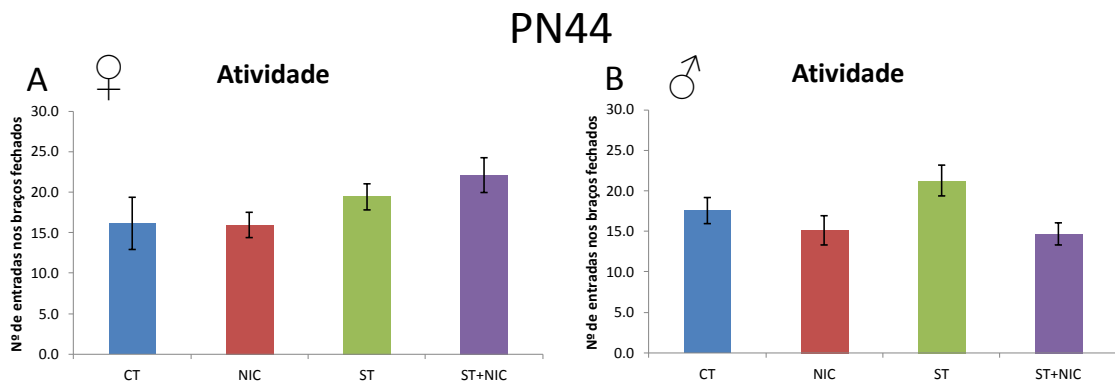


Legenda: a) Tempo, em percentual, de permanência de fêmeas no centro do labirinto em cruz elevado. b) Tempo, em percentual, de permanência de machos no centro do labirinto em cruz elevado.

Nota: Fêmeas não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. Machos expostos a somente nicotina ou somente estresse apresentaram redução no tempo do centro em comparação com o controle. A exposição à nicotina em combinação com estresse reverteu esse efeito. A análise bidimensional indicou interações entre a exposição à nicotina e estresse, mostrado na reversão dos efeitos de cada tratamento no grupo NIC+ST, sugerindo um efeito menos que aditivo. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

Para a medida de atividade motora, não observamos diferenças significativas entre os grupos expostos quando comparados ao controle (Gráficos 8).

## Gráficos 8 – Parâmetros de atividade locomotora em PN44



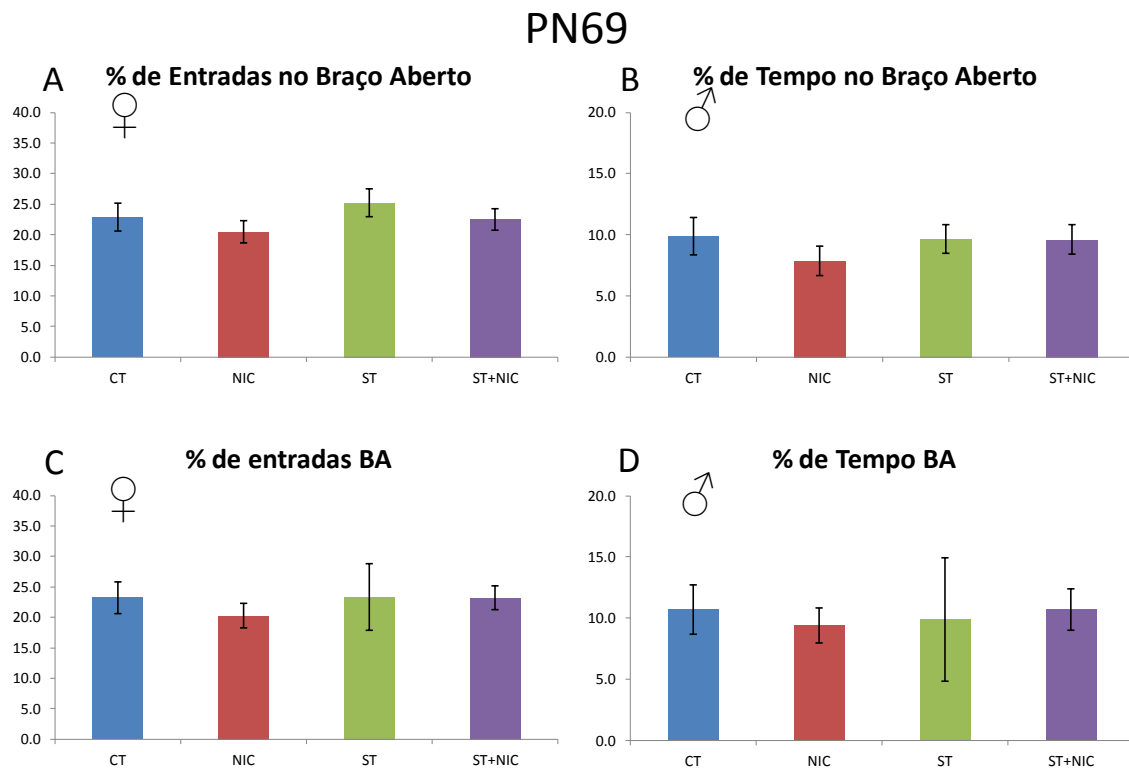
Legenda: a) Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado em fêmeas. b) Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado em machos.

Nota: Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado.

### 3.2.1.3 Labirinto em cruz elevado após um longo período de retirada (PN69)

A ANOVA não indicou efeito do TRATAMENTO, como também não foi verificada interação entre TRATAMENTO e SEXO para nenhuma das variáveis analisadas.

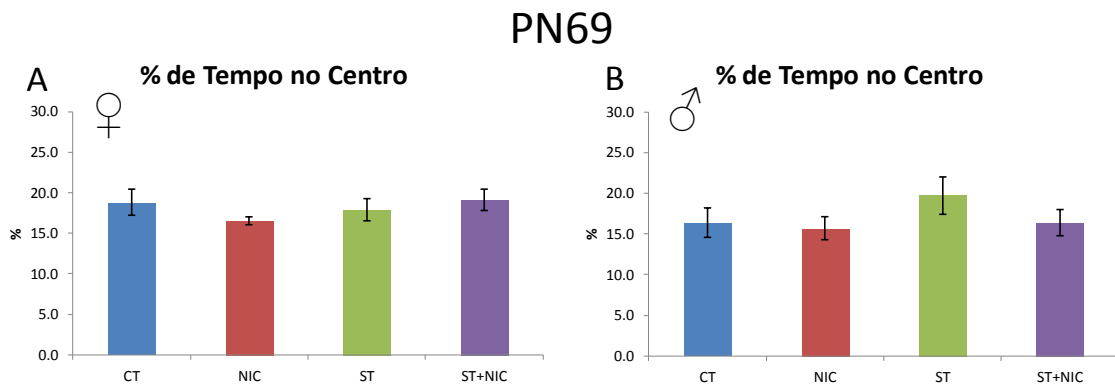
Gráficos 9 – Parâmetros de ansiedade em PN69.



Legenda: a) Percentual de entradas nos braços abertos em fêmeas. b) Percentual de entradas nos braços abertos em machos. c) Percentual de permanência nos braços abertos em fêmeas. d) Percentual de permanência nos braços abertos em machos.

Nota: Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos para as variáveis associadas à ansiedade analisadas.

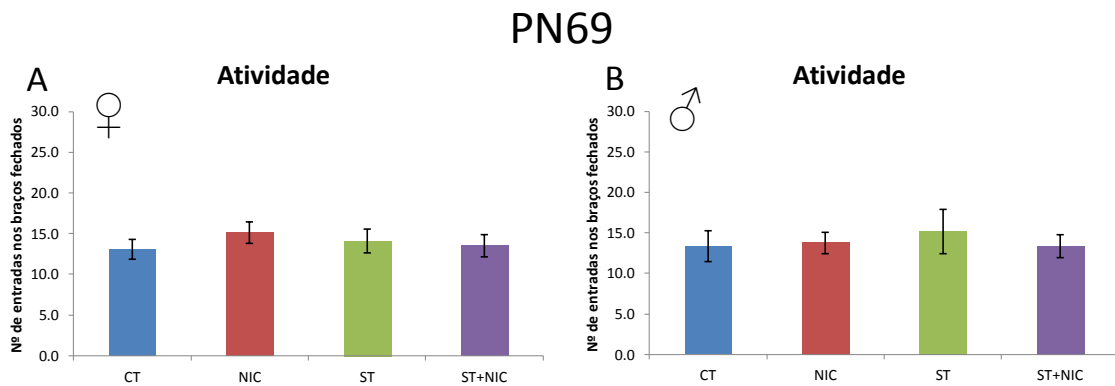
Gráficos 10 – Parâmetros de tomada de decisão em PN69.



Legenda: a) Tempo, em percentual, de permanência de fêmeas no centro do labirinto em cruz elevado. b) Tempo, em percentual, de permanência de machos no centro do labirinto em cruz elevado.

Nota: Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos para o tempo de permanência no centro do aparelho.

Gráficos 11 – Parâmetros de atividade locomotora em PN69.



Legenda: a) Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado em fêmeas. b) Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado em machos.

Nota: Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado.

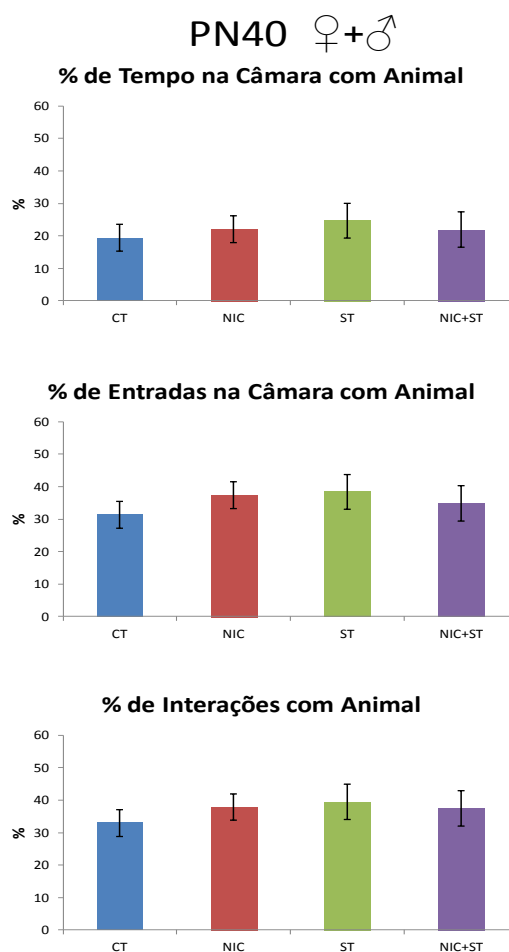
### 3.2.2 Teste social de três câmaras

Considerando a ausência, em todas as idades, de diferenças entre os sexos (interações entre TRATAMENTO E SEXO), os dados de machos e fêmeas no teste social de três câmaras serão apresentados colapsados.

### 3.2.2.1 Teste social de três câmaras o final do período de exposição (PN40)

A ANOVA não indicou efeito do TRATAMENTO, como também não foi verificada interação entre TRATAMENTO e SEXO (Gráficos 12).

Gráficos 12 – Parâmetros de sociabilidade em PN40



Legenda: a) Percentual de tempo despendido na câmara com o animal não-familiar. b) Percentual de entradas na câmara com o animal não-familiar. c) Percentual de interações com a gaiola do animal não-familiar, em relação ao total de interações com ambas as gaiolas.

Nota: Não foram observadas alterações nas medidas de sociabilidade entre os tratamentos.

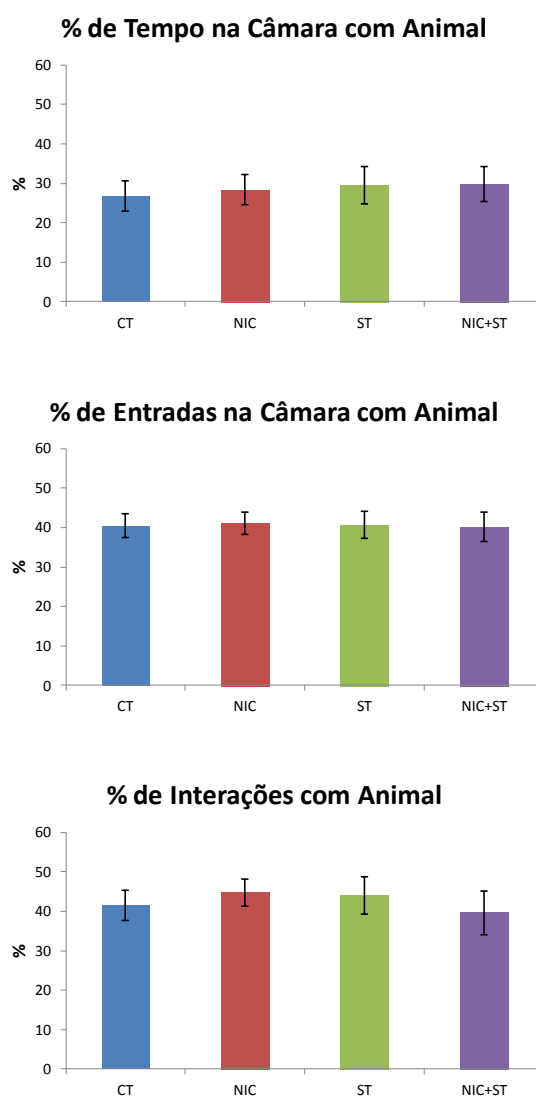


### 3.2.2.2 Teste social de três câmaras após um curto período de retirada (PN45)

De modo similar a PN45, a ANOVA não indicou efeito do TRATAMENTO, como também não foi verificada interação entre TRATAMENTO e SEXO (Gráficos 13).

Gráficos 13 – Parâmetros de sociabilidade em PN45

PN45 ♀+♂



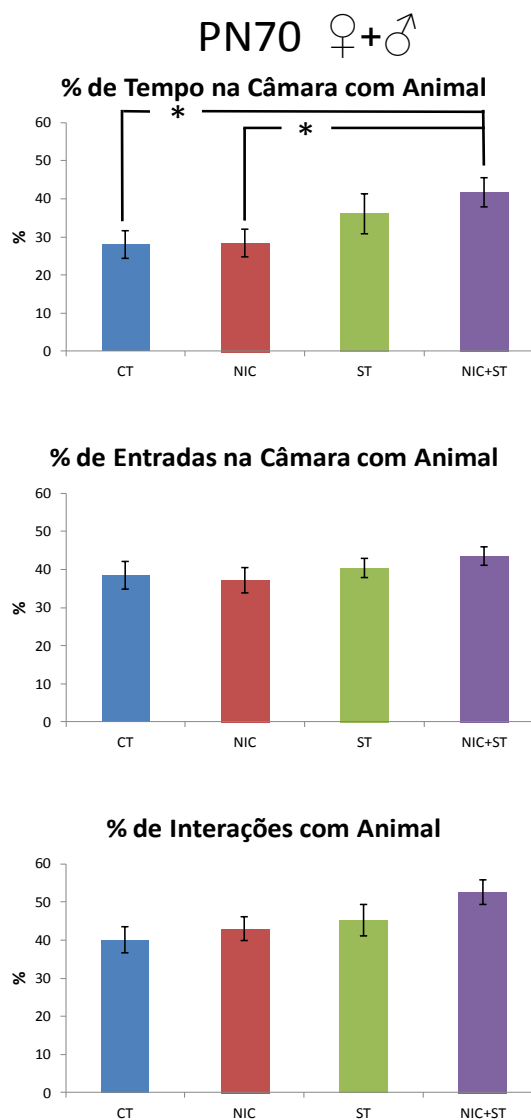
Legenda: a) Percentual de tempo despendido na câmara com o animal não-familiar. b) Percentual de entradas na câmara com o animal não-familiar. c) Percentual de interações com a gaiola do animal não-familiar, em relação ao total de interações com ambas as gaiolas.

Nota: Não foram observadas alterações nas medidas de sociabilidade entre os tratamentos.

### 3.2.2.3 Teste social de três câmaras após um longo período de retirada (PN70)

A ANOVA indicou efeito do TRATAMENTO ( $F = 3,9$ , d.f. = 3,  $P < 0,05$ ) para o percentual de tempo na câmara que continha o animal não-familiar. Animais do grupo NIC+ST apresentaram aumento do tempo na câmara quando comparado com controles ( $P < 0,05$ ) e com animais do grupo NIC ( $P < 0,05$ , Gráficos 14).

Gráficos 14 – Parâmetros de sociabilidade em PN70



Legenda: a) Percentual de tempo despendido na câmara com o animal não-familiar. b) Percentual de entradas na câmara com o animal não-familiar. c) Percentual de interações com a gaiola do animal não-familiar, em relação ao total de interações com ambas as gaiolas.

Nota: Animais expostos à nicotina e estresse na adolescência apresentaram uma elevação no tempo de permanência na câmara contendo o animal não-familiar, quando comparados ao controle e aos animais expostos somente à nicotina. \*  $P < 0,05$

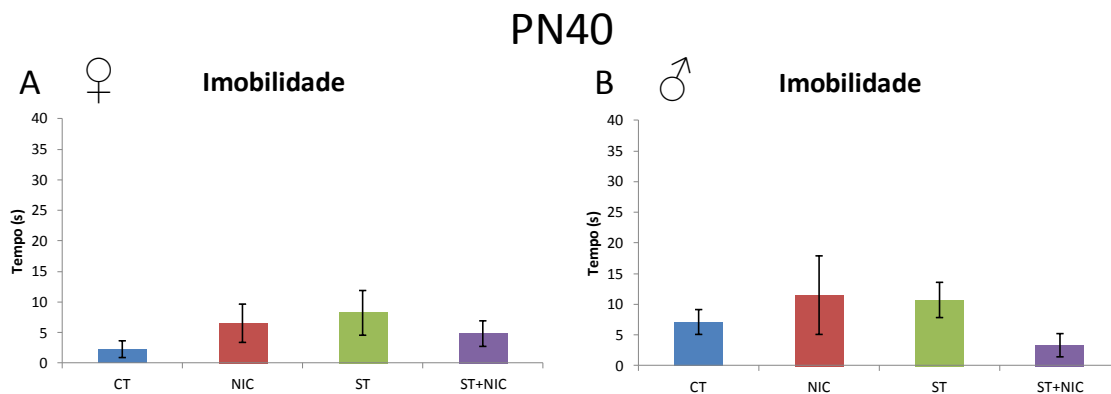
### 3.2.3 Teste do nado forçado

Os dados a seguir foram obtidos a partir do teste do nado forçado.

#### 3.2.3.1 Teste do nado forçado ao final do período de exposição (PN40)

Para todas as variáveis medidas, a ANOVA não indicou efeito do TRATAMENTO, como também não foi verificada interação entre TRATAMENTO e SEXO (Gráficos 15). A ausência de diferenças significativas também foi observada quando considerada a frequência de imobilidades (Tabela 2).

Gráficos 15 – Parâmetros de comportamento associado à depressão em PN40



Legenda: a) Tempo de imobilidade no teste do nado forçado em fêmeas. b) Tempo de imobilidade no teste do nado forçado em machos.

Nota: Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade no nado forçado.

Tabela 2 - Frequência do comportamento de imobilidade no teste do nado forçado.

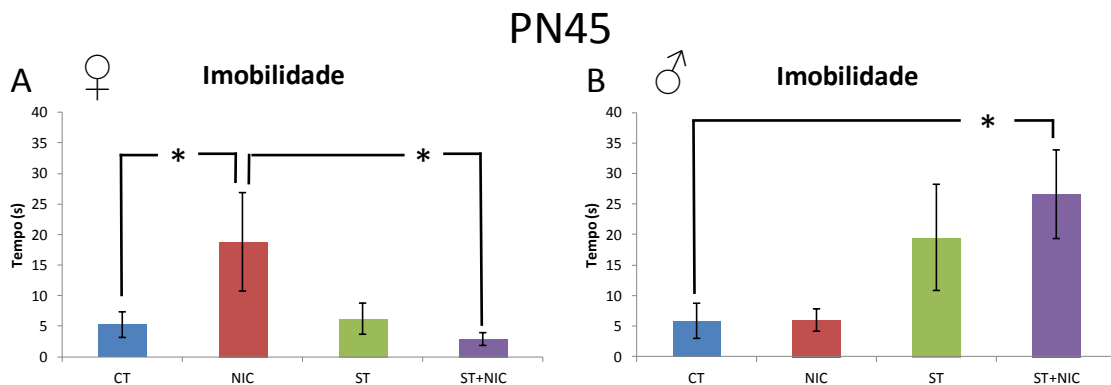
<b>IDADE</b>	<b>Grupo</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>
<b>PN40</b>	CT	4,2 ± 2,1	9,0 ± 2,9
	NIC	6,6 ± 3,1	7,3 ± 3,1
	ST	5,6 ± 1,8	8,6 ± 2,6
	ST+NIC	4,8 ± 1,7	3,2 ± 1,5
<b>PN50</b>	CT	4,3 ± 1,5	4,1 ± 1,4
	NIC	6,6 ± 2,6	7,3 ± 3,0
	ST	5,7 ± 2,3	4,3 ± 1,6
	ST+NIC	8,8 ± 2,7	15,3 ± 2,5**
<b>PN70</b>	CT	11,4 ± 2,4	11,5 ± 1,8
	NIC	5,3 ± 1,5	13,8 ± 2,9
	ST	6,3 ± 2,0	7,1 ± 1,8
	ST+NIC	6,5 ± 2,0	8,0 ± 2,3

\*\*P<0,01 em comparação com o grupo CT

### 3.2.3.2 Teste do nado forçado após um curto período de retirada (PN45)

Em relação ao tempo de imobilidade, a ANOVA indicou interação TRATAMENTOxSEXO ( $F=4,5$ ; d.f. = 3;  $P<0,01$ ). Observamos um aumento no tempo de imobilidade em fêmeas do grupo NIC, quando comparadas com os grupos controle e NIC+ST ( $P<0,05$  em ambos os casos, Gráfico 16A). Em machos observamos um aumento no tempo de imobilidade no grupo da dupla exposição (NIC+ST) em comparação com o controle ( $P<0,05$ ) (Gráfico 16B). Além disso, machos do grupo da co-exposição NIC+ST apresentaram uma maior frequência do comportamento de imobilidade quando comparados a todos os outros grupos experimentais (NIC+ST>CT,  $P<0,01$ ; NIC+ST>NIC,  $P<0,05$ ; NIC+ST>ST,  $P<0,05$ ; Tabela 2). A análise bidimensional não indicou interações significativas da exposição à nicotina com o estresse, indicando um efeito aditivo da nicotina e do estresse.

Gráficos 16 – Parâmetros de comportamento associado à depressão em PN45.



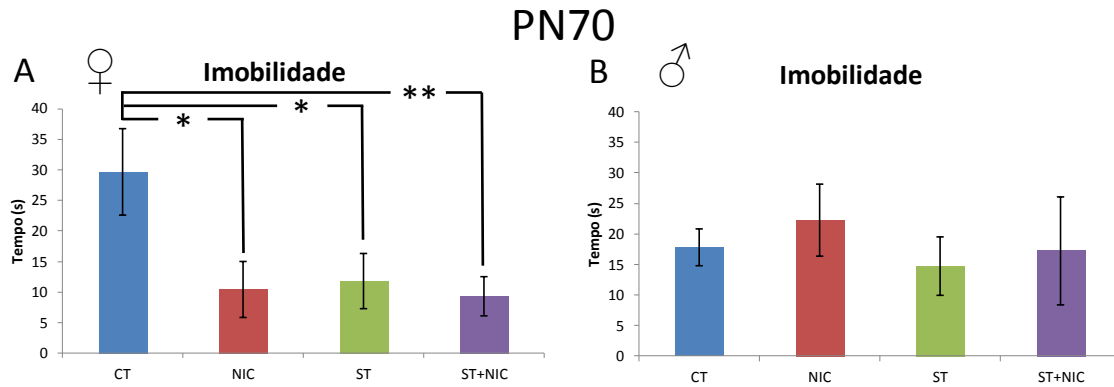
Legenda: a) Tempo de imobilidade no teste do nado forçado em fêmeas. b) Tempo de imobilidade no teste do nado forçado em machos.

Nota: Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no tempo de imobilidade no nado forçado. Fêmeas expostas à nicotina apresentaram um tempo maior de imobilidade no teste do nado forçado quando comparadas às fêmeas controle. A exposição simultânea ao estresse em conjunto com a nicotina impediu o aparecimento desse efeito. Machos expostos à nicotina e estresse apresentaram um maior tempo de imobilidade em comparação com todos os outros grupos experimentais. \*  $P < 0,05$

### 3.2.3.3 Teste do nado forçado após um longo período de retirada (PN70)

A ANOVA somente indicou efeito do TRATAMENTO para o tempo de imobilidade nas fêmeas ( $F = 3,5$ ,  $d.f = 3$ ,  $P < 0,05$ ). Este efeito pode ser explicado pelo fato das fêmeas dos grupos expostos apresentarem redução no tempo total de imobilidade quando comparadas as fêmeas controles ( $CT > NIC$ ,  $P < 0,05$ ;  $CT > ST$ ,  $P < 0,05$  e  $CT > ST+NIC$ ,  $P < 0,01$ ). A análise bidimensional não indicou interações significativas entre exposição à nicotina e ao estresse, indicando uma somação do efeito da nicotina e do estresse (Gráfico 17). Não foram observadas diferenças significativas quando considerado a frequência dos comportamentos estudados.

Gráficos 17 - Parâmetros de comportamento associado à depressão em PN70.



Legenda: a) Tempo de imobilidade no teste do nado forçado em fêmeas. b) Tempo de imobilidade no teste do nado forçado em machos.

Nota: Fêmeas expostas a nicotina, estresse e nicotina + estresse apresentaram uma redução no tempo de imobilidade em comparação com fêmeas controle. A análise bidimensional não indicou interações entre a exposição à nicotina e estresse, sugerindo um efeito de somação entre os tratamentos no grupo NIC+ST. Não foram verificadas alterações no tempo de imobilidade no nado forçado entre os grupos experimentais em machos. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Resumo dos resultados

Um grande número de evidências aponta que áreas e sistemas cerebrais envolvidos na resposta ao estresse desempenham um papel crítico na iniciação e manutenção do fumo de cigarros, e relapso após o término do uso (Bruijnzeel AW., 2012). Além disso, o seu consumo leva a maiores níveis de estresse diário em seus usuários. Entretanto são escassos os trabalhos em neurobiologia básica que avaliem a interação entre ambos os fatores em especial durante a adolescência, período considerado de grande vulnerabilidade. No presente trabalho o estresse foi capaz de promover menor ganho de massa corporal durante a adolescência e o consumo de nicotina não foi capaz de alterar este efeito. De forma semelhante, o estresse não afetou o consumo da solução de nicotina. Nosso modelo não foi capaz de alterar os níveis de ansiedade avaliados pelo teste do EPM. Entretanto, a exposição combinada (ESTRESSE+NICOTINA) ao final do período de exposição promoveu um aumento no tempo de permanência no centro do aparelho e gerou hiperatividade em ambos os sexos. Na avaliação da sociabilidade e do comportamento tipo depressivo, só observamos alterações após o período de retirada. Na avaliação do comportamento tipo depressivo, os efeitos foram dependentes do sexo. Após curto período de abstinência pela nicotina, fêmeas apresentaram aumento do comportamento tipo depressivo, sendo este efeito revertido quando a exposição à nicotina se deu de forma combinada ao estresse. De forma contrária, a exposição combinada gerou aumento do comportamento tipo depressivo em machos. De modo inesperado, as fêmeas de todos os grupos expostos (NIC, ST e NIC+ST) apresentaram diminuição do comportamento tipo depressivo na idade adulta. Em relação ao TS, nossos resultados sugerem um aumento de sociabilidade no grupo submetido à exposição combinada somente após longo período de interrupção da exposição.



## 4.2 Alterações em ingestão de líquido e massa corporal

Estudos em humanos e animais têm demonstrado que a administração de nicotina pode levar a uma menor ingestão calórica e, conseqüentemente, diminuição da massa corporal (Grunberg, 1986; Hajek et al., 1988; Bishop et al., 2004; Klein et al., 2004). Desta forma, a nicotina tem sido considerada o mediador da redução da massa corporal em tabagistas (Hajek et al., 1988). Entretanto, no presente estudo a dose diária e o período de administração não resultaram em efeitos anorexigênicos significativos associados à exposição de nicotina. Por outro lado, nossos dados indicam uma importante redução do ganho de massa corporal gerado pela exposição ao estresse, onde ambos os grupos estressados (ST e NIC+ST) apresentaram menor ganho de massa corporal a partir do 4º dia de exposição ao estresse. Este resultado é consistente com o que é normalmente observado em modelos crônicos/sub-crônicos de estresse de contenção na literatura, onde em média podemos observar redução de massa corporal após 2-5 dias da indução de estresse diário (Faraday et al., 2005; Cruz et al., 2012; Doremus-Fitzwater et al., 2009). Como esperado, tem sido sugerido que este efeito é mais intenso na adolescência do que na vida adulta (Doremus-Fitzwater et al., 2009; Stone e Quartermain, 1998).

Duas hipóteses principais podem explicar esse efeito do estresse sobre a massa corporal. A primeira hipótese é derivada dos efeitos periféricos gerados pelo aumento da concentração sérica de corticosterona, principal glicocorticoide em roedores. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) modula as respostas fisiológicas frente a uma situação de estresse agudo e crônico (Bugajski et al., 1999). Os glicocorticoides possuem múltiplas ações, entre elas, promovem aumento da gliconeogênese (Stone e Quartermain, 1998). O aumento da gliconeogênese pode de forma geral diminuir a disponibilidade de aminoácidos para a síntese proteica e, conseqüentemente, promover menor taxa de crescimento muscular e ósseo no desenvolvimento corporal durante a adolescência. Deste modo, o aumento da gliconeogênese poderia explicar a redução do ganho de massa corporal nos nossos animais. Além desta possibilidade, tem sido demonstrado que estresse crônico por contenção promove redução do consumo de ração (Faraday et al., 2005; Stone e Quartermain, 1998). Desta forma, é provável que a redução de peso nos grupos ST e ST+NIC seja fruto da associação destes dois efeitos gerados pelo estresse.

Roedores de modo geral demonstram aversão ao gosto da nicotina. Este fato pode explicar o motivo da diminuição da ingestão de líquido de forma tratamento-dependente, onde

apenas os grupos que receberam a solução de nicotina (NIC e ST+NIC) apresentaram menor consumo de líquido. Apesar de nem todos os estudos que utilizaram o modelo de administração via oral de nicotina indicarem este efeito (Ribeiro-Carvalho et al., 2008), a maioria dos trabalhos com este modelo demonstram redução na ingestão de líquido (Abreu-Villaça et al., 2008; Ribeiro-Carvalho et al., 2009; Ribeiro-Carvalho et al., 2011). Outra possibilidade para esta redução pode se dar pelo fato de a nicotina ter ação antidiurética, provavelmente, pela estimulação hipotalâmica, que resulta na alteração da liberação do hormônio antidiurético pela neurohipófise (Finch et al., 2004, Pomerleau, 1992). Vale ressaltar que a redução da ingestão de líquido observada não afetou o ganho de peso destes animais, desta forma, acreditamos que esta redução não seja fator relevante nas diferenças comportamentais observadas no presente estudo.

Outra questão importante na interpretação dos resultados é se o estresse poderia afetar diretamente o consumo de nicotina gerando padrão de dose diária diferente entre os grupos NIC e NIC+ST. De fato, evidências sugerem que o estresse pode aumentar o consumo de nicotina em modelos animais (Adriani et al., 2002), entretanto não encontramos diferenças significativas no consumo de nicotina entre os animais que receberam somente solução de nicotina (NIC) e animais que receberam a solução de nicotina de forma concomitante à exposição ao estresse. Desta forma, não acreditamos que as diferenças comportamentais encontradas entre os grupos NIC e NIC+ST sejam fruto de um padrão diferente de exposição à nicotina.

#### **4.3 Efeitos da nicotina e/ou estresse sobre ansiedade, tomada de decisão e atividade locomotora**

Dados epidemiológicos revelam que fumantes possuem maior probabilidade de apresentar transtornos psiquiátricos, incluindo transtornos de ansiedade (Lasser et al., 2000). Estudos com fumantes adultos têm mostrado que uso do tabaco pode reduzir a ansiedade, sendo este efeito normalmente atribuído à nicotina presente nos cigarros (Kassel e Unrod, 2000). Assim, tem sido sugerido que fumantes continuam a fumar a fim regular seu estado de ansiedade (Gilbert et al., 1989; Picciotto et al, 2002). Em contraste, em adolescentes há um aumento dos níveis de ansiedade durante a exposição, apesar de ser sugerido que a ansiedade também possa ser sintoma de retirada da nicotina (Hughes et al, 2000; Parrot, 2003), podendo

estar envolvida como fator para a manutenção do hábito de fumar em humanos (Koob et al., 1993; Watkins et al., 2000). Em roedores, tem se mostrado que a nicotina pode ser ansiogênica, ansiolítica ou não causar alterações nos níveis de ansiedade (Broni et al., 1993; Irvine et al., 1999, 2001; Ouagazzal et al., 1999). Em um estudo anterior do nosso laboratório, utilizando um modelo semelhante de administração oral de nicotina durante a adolescência (entre PN30 e 45), observamos que, após curto período de retirada, a nicotina promoveu aumento da ansiedade apenas em camundongos fêmeas no EPM (Abreu-Villaça et al., 2008). No presente trabalho, não observamos efeito da exposição à nicotina sobre as variáveis associadas à ansiedade. Esta ausência de resultado pode ser explicada pelo menor tempo de exposição utilizado neste trabalho (PN30-40). Outra possibilidade é existência de diferenças na suscetibilidade à alteração da resposta ansiogênica entre as diferentes cepas de camundongos, pois em nosso estudo prévio foram utilizados camundongos da cepa C57BL/6. De fato, tem sido reportado que cepas diferentes podem apresentar diferentes sensibilidades a efeitos ansiogênicos/ansiolíticos no teste do EPM (Hogg, 1996).

No presente trabalho também não observamos efeito do estresse sobre os níveis de ansiedade em camundongos adolescentes. De fato, os dados da literatura não são conclusivos em relação aos efeitos esperados. Dependendo do modelo de indução ao estresse e do período de exposição podemos verificar que durante a adolescência o estresse pode gerar efeito ansiogênico (Stone e Quartermain, 1998), ansiolítico (McCormick et al., 2008) ou não apresentar efeito (Bourke e Neigh, 2011). De forma geral, tem sido demonstrado que modelos de estresse não previsíveis geram respostas emocionais mais intensas que o modelo de contenção (Cruz et al., 2012).

Interessantemente, ao final do período de exposição, animais que receberam a exposição isolada ao estresse demonstraram em média um aumento não significativo do tempo no centro da arena do EPM, entretanto, quando a exposição ao estresse se deu de forma concomitante a nicotina este efeito foi amplificado gerando diferenças significativas. Há muita discussão na literatura sobre qual seria o significado biológico mais adequado desta variável. Trullas e colaboradores (1991) mostraram que um medicamento ansiolítico benzodiazepínico, clordiazepóxido, diminui o tempo no centro da arena do EPM. Em contraste, um ligante de glicina, associado com um agonista parcial do receptor de NMDA, aumenta o tempo no centro apesar de possuir efeito ansiolítico no EPM. Além disso, foi demonstrado que benzodiazepínicos reduzem o comportamento de decisão em ratos. Tomados em conjunto estes resultados sugerem que o tempo no centro do EPM pode refletir a capacidade de resolução de conflitos (Wall e Messier, 2001). Neste sentido, nosso resultado

sugere que animais expostos ao estresse e nicotina concomitantemente apresentam dificuldade na tomada de decisão, refletida pelo maior tempo na parte central da arena. Após curto período de retirada apenas machos do grupo estressado e do grupo exposto à nicotina isoladamente apresentaram redução do tempo no centro. Este efeito sugere que a abstinência da nicotina e a retirada do evento estressor geram menor tempo na resolução de conflito, o que pode indicar impulsividade.

Estudos prévios mostram que camundongos são sensíveis aos efeitos de ativação locomotora da nicotina (Saito et al, 2005; Ulusu et al, 2005), inclusive durante a adolescência (Abreu-Villaça et al., 2008). De forma interessante, apesar de a nicotina não ter sido capaz de apresentar este efeito no presente trabalho, a exposição concomitante com estresse gerou hiperatividade em ambos os sexos. Em fêmeas, os nossos resultados sugerem que o estresse foi capaz de aumentar a susceptibilidade aos efeitos da nicotina sobre a atividade locomotora. Sabe-se que a nicotina pode ativar neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo e terminais dopaminérgicos pré-sinápticos no estriato, levando a liberação de dopamina, desta forma modulando o controle dopaminérgico sobre a atividade locomotora e, paralelamente, sobre os processos de recompensa (Calabresi et al., 1989; Picciotto et al., 1998; Pidoplichko et al., 1997). O efeito observado no nosso modelo pode ser relevante na geração de maior suscetibilidade das fêmeas na resposta de recompensa e no desenvolvimento de dependência a nicotina. Em acordo com esta ideia, McCormick e colaboradores (2004) demonstraram que estresse social durante a adolescência aumenta a sensibilização da nicotina na resposta locomotora em fêmeas. No nosso estudo, a hiperatividade observada em machos do grupo da exposição combinada ST+NIC parece refletir o efeito da exposição ao estresse, sugerindo que a nicotina não é capaz de alterar este efeito.

#### **4.4 Efeitos da nicotina e/ou estresse sobre o comportamento social**

O reconhecimento social é crítico para o estabelecimento e manutenção da estrutura social em animais que vivem em grupos (Kerckmar et al., 2011). A adolescência, em especial a puberdade, tem sido descrita como período importante no desenvolvimento do comportamento social (Spear, 2000) e eventos estressores neste período podem afetar o comportamento social do indivíduo quando adulto (Huang et al., 2013; Kerckmar et al., 2011). O tipo de evento estressor parece ser fator fundamental nas alterações no comportamento

social em modelos animais. Estresse por isolamento social na adolescência promove aumento do tempo de interação social na idade adulta, sugerindo alteração no processo de reconhecimento social (Kercmar et al., 2011). Por outro lado, quando é realizado estresse por enfrentamento social há uma diminuição da interação social na vida adulta (Huang et al., 2013). No presente trabalho, utilizando um modelo de estresse sem caráter social, observamos que a exposição ao estresse durante a adolescência também não promoveu alterações significativas no comportamento social, entretanto, quando o estresse foi associado ao consumo de nicotina ocorreu um aumento do tempo de interação social nos animais adultos. Este resultado poderia ser explicado por uma redução na capacidade de reconhecimento social. Porém, para a confirmação desta hipótese seria necessária a realização de uma sequência de testes sociais na presença do mesmo animal não-familiar para que pudesse ser verificado o fenômeno de habituação, onde em situações normais ocorreria a redução progressiva do tempo de interação social. Outros modelos de testes sociais que permitam a identificação da modalidade da interação social (reconhecimento, agressividade e comportamento de brincar) seriam interessantes no entendimento deste fenômeno.

#### **4.5 Efeitos da nicotina e/ou estresse sobre o comportamento tipo depressivo**

Depressão e uso/abuso de drogas são dois dos problemas mais importantes de saúde pública em relação a adolescentes (Shivola et al., 2008). Estudos epidemiológicos têm sugerido que existe uma relação causal entre ambos os problemas. Esta relação parece ser bidirecional, de forma que o uso de drogas pode precipitar o surgimento de um estado depressivo, assim como a depressão prévia na adolescência pode favorecer o uso de drogas e/ou facilitar os mecanismos de dependência (Shilova et al. 2008). Resultados de um estudo do nosso laboratório indicaram que um curto período de abstinência a nicotina durante a adolescência pode aumentar o comportamento tipo depressivo apenas em fêmeas (Ribeiro-Carvalho et al. 2011). Este resultado foi corroborado no presente estudo, onde fêmeas também se mostraram mais suscetíveis ao efeito de retirada de curto prazo da nicotina. Neste sentido, nosso resultado é consistente com a idéia a abstinência a nicotina na adolescência pode alterar certas funções emocionais de maneira sexo-dependente.

No presente estudo, o estresse não gerou resposta suficientemente intensa para causar comportamento tipo-depressivo. Apesar do aumento médio do tempo de imobilidade em

machos após curto período de retirada, este não chegou significância estatística. A literatura mostra respostas variadas ao estresse dependendo da cepa, sexo, idade, tipo e tempo de evento estressor, como também, a duração da sua exposição (Faraday et al., 2005; Ver Hoeve et al., 2013; Hong et al., 2012). É interessante apontar que os nossos resultados indicam um dimorfismo sexual na resposta aos efeitos da exposição combinada do estresse com a nicotina. A exposição concomitante ao estresse reverteu o efeito depressivo da abstinência de curto prazo da nicotina em fêmeas. De forma oposta ao observado em fêmeas, machos somente apresentaram comportamento tipo depressivo durante um curto período de abstinência a nicotina quando foram expostos de forma concomitante ao estresse. Este resultado sugere que o estresse pode alterar a função cerebral de forma diferente entre machos e fêmeas, podendo gerar consequências diferentes na suscetibilidade ao efeito de drogas. Recentemente, Weathington e colaboradores (*in press*) mostraram que a distribuição de receptores para CRF é sexualmente dimórfica em diversas regiões cerebrais durante a adolescência. Considerando que a exposição à nicotina durante a adolescência promove *upregulation* dos receptores para CRF no córtex frontal e hipotálamo em ratos machos que apresentam comportamento tipo depressivo (Slawecki et al., 2005), podemos sugerir que a exposição à nicotina pode ter intensificado o efeito do estresse induzido pelo FST em nosso estudo. Futuros estudos que investiguem o dimorfismo sexual do eixo HHA e dos sistemas neurais de resposta ao estresse são de fundamental importância no entendimento da relação entre estresse e drogas de abuso na geração de distúrbios psiquiátricos. Curiosamente, fêmeas de todos os grupos experimentais apresentaram diminuição do tempo de imobilidade na idade adulta após longo período de retirada, indicando que tanto a nicotina quanto o estresse durante a adolescência podem gerar consequências comportamentais na vida adulta, sendo as fêmeas, nesse modelo, mais suscetíveis a efeitos de longo prazo que machos.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicam que as exposições à nicotina e ao estresse interagem durante a adolescência de forma sexo-dependente gerando alterações tanto durante o período de exposição como após a sua interrupção, podendo até mesmo gerar alterações comportamentais que repercutem tardiamente na vida adulta. No presente estudo observamos que a exposição combinada a nicotina e estresse:

- a) Gerou um aumento no tempo de tomadas de decisão e hiperatividade durante período de exposição;
- b) Gerou comportamento tipo depressivo após curto período de retirada em machos e reverteu o efeito da abstinência à nicotina em fêmeas;
- c) Levou a aumento do tempo de sociabilização na vida adulta.

O conhecimento das alterações geradas pela exposição combinada de estresse e nicotina é de fundamental importância para o entendimento das alterações psiquiátricas que diminuem a motivação e aumentam o risco de recaída do tabagismo. Futuros estudos sobre o papel das vias de resposta ao estresse na geração das alterações emocionais geradas pela interação entre estresse e nicotina abrirão possibilidade de criação de terapias mais eficientes no tratamento do tabagismo.

## REFERÊNCIAS

- ABREU-VILLACA, Y. et al. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine Tob Res*, v. 12, n. 7, p. 776-80, Jul 2010. ISSN 1469-994X
- ABREU-VILLACA, Y. et al. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 3, p. 599-610, Feb 2008. ISSN 0893-133X
- ABREU-VILLACA, Y.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology*, v. 29, n. 8, p. 1440-50, Aug 2004. ISSN 0893-133X
- ABREU-VILLACA, Y. et al. Prenatal nicotine exposure alters the response to nicotine administration in adolescence: effects on cholinergic systems during exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, v. 29, n. 5, p. 879-90, May 2004. ISSN
- ADRIANI, W. et al. Restricted daily access to water and voluntary nicotine oral consumption in mice: methodological issues and individual differences. *Behav Brain Res*, v. 134, n. 1-2, p. 21-30, Aug 21 2002. ISSN 0166-4328
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*, v. 301, n. 3, p. 365-81, Nov 15 1990. ISSN 0021-9967
- ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev*, v. 27, n. 1-2, p. 3-18, Jan-Mar 2003. ISSN 0149-7634
- ARNETT, J. J. The psychology of globalization. *Am Psychol*, v. 57, n. 10, p. 774-83, Oct 2002. ISSN 0003-066X
- BALBANI, A. P.; MONTOVANI, J. C. Methods for smoking cessation and treatment of nicotine dependence. *Braz J Otorhinolaryngol*, v. 71, n. 6, p. 820-7, Nov-Dec 2005. ISSN 1808-8694
- BATTISTA, S. R. et al. A further investigation of the relations of anxiety sensitivity to smoking motives. *Addict Behav*, v. 33, n. 11, p. 1402-8, Nov 2008. ISSN 1873-6327
- BAUMRIND, D. A developmental perspective on adolescent risk taking in contemporary America. *New Dir Child Dev*, n. 37, p. 93-125, Fall 1987. ISSN 0195-2269
- BAUZO, R. M.; BRUIJNZEEL, A. W. Animal models of nicotine withdrawal: intracranial self-stimulation and somatic signs of withdrawal. *Methods Mol Biol*, v. 829, p. 257-68, 2012. ISSN 1940-6029
- BAYER, S. A. 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res*, v. 50, n. 2-3, p. 329-40, 1983. ISSN 0014-4819



- BAYER, S. A.; YACKEL, J. W.; PURI, P. S. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, v. 216, n. 4548, p. 890-2, May 21 1982. ISSN 0036-8075
- BENJET, C. et al. The relationship of tobacco smoking with depressive symptomatology in the Third Mexican National Addictions Survey. *Psychol Med*, v. 34, n. 5, p. 881-8, Jul 2004. ISSN 0033-2917
- BENOWITZ, N. L. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med Clin North Am*, v. 76, n. 2, p. 415-37, Mar 1992. ISSN 0025-7125
- BENOWITZ, N. L.; GOURLAY, S. G. Cardiovascular toxicity of nicotine: implications for nicotine replacement therapy. *J Am Coll Cardiol*, v. 29, n. 7, p. 1422-31, Jun 1997. ISSN 0735-1097
- <sup>1</sup>BOGDANOVA, O. V. et al. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav*, v. 118, p. 227-39, Jun 13 2013. ISSN 1873-507X
- BOURKE, C. H.; NEIGH, G. N. Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Horm Behav*, v. 60, n. 1, p. 112-20, Jun 2011. ISSN 1095-6867
- BRESLAU, N.; KLEIN, D. F. Smoking and panic attacks: an epidemiologic investigation. *Arch Gen Psychiatry*, v. 56, n. 12, p. 1141-7, Dec 1999. ISSN 0003-990X
- BRESLAU, N.; NOVAK, S. P.; KESSLER, R. C. Psychiatric disorders and stages of smoking. *Biol Psychiatry*, v. 55, n. 1, p. 69-76, Jan 1 2004. ISSN 0006-3223
- BRIONI, J. D. et al. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol*, v. 238, n. 1, p. 1-8, Jul 6 1993. ISSN 0014-2999
- BROWN, R. A. et al. Cigarette smoking, major depression, and other psychiatric disorders among adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, v. 35, n. 12, p. 1602-10, Dec 1996. ISSN 0890-8567
- BYNNER J. *Social change and the sequencing of developmental transitions*. L. Crockett, Silbereisen R. (Eds.), *Negotiating Adolescence in Times of Social Change*, 2000. Cambridge University Press, Cambridge, MA, pp. 89–103
- CALABRESI, P. et al. Endogenous ACh enhances striatal NMDA-responses via M1-like muscarinic receptors and PKC activation. *Eur J Neurosci*, v. 10, n. 9, p. 2887-95, Sep 1998. ISSN 0953-816X
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005. ISSN 0149-7634
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mentalhealthsurveillance/faqs.html#economic>>. Acessado em 26 dez. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Tobacco use among high school students — United States, 1997. 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 47: 229-233.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trends in cigarette smoking among high school students: United States, 1991-1999. 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49: 755-758.

CHARIL, A. et al. Prenatal stress and brain development. *Brain Res Rev*, v. 65, n. 1, p. 56-79, Oct 5 2010. ISSN 1872-6321

CHEN, J.; MILLAR, W. J. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep*, v. 9, n. 4, p. 39-46(Eng); 39-48(Fre), Spring 1998. ISSN 0840-6529

CHEN, K.; KANDEL, D. B. The natural history of drug use from adolescence to the mid-thirties in a general population sample. *Am J Public Health*, v. 85, n. 1, p. 41-7, Jan 1995. ISSN 0090-0036

CHEREK, D. R. Effects of acute exposure to increased levels of background industrial noise on cigarette smoking behavior. *Int Arch Occup Environ Health*, v. 56, n. 1, p. 23-30, 1985. ISSN 0340-0131

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 49, n. 1, p. 171-6, Sep 1994. ISSN 0091-3057

CRUZ, F. C. et al. Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. *Int J Dev Neurosci*, v. 30, n. 1, p. 19-23, Feb 2012. ISSN 1873-474X

DAHL, R. E. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1021, p. 1-22, Jun 2004. ISSN 0077-8923

DAHL, R. E.; GUNNAR, M. R. Heightened stress responsiveness and emotional reactivity during pubertal maturation: implications for psychopathology. *Dev Psychopathol*, v. 21, n. 1, p. 1-6, Winter 2009. ISSN 1469-2198

DANI, J. A.; HEINEMANN, S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*, v. 16, n. 5, p. 905-8, May 1996. ISSN 0896-6273

DE BELLIS, M. D. et al. Sex differences in brain maturation during childhood and adolescence. *Cereb Cortex*, v. 11, n. 6, p. 552-7, Jun 2001. ISSN 1047-3211

DIERKER, L. C. et al. Smoking and depression: an examination of mechanisms of comorbidity. *Am J Psychiatry*, v. 159, n. 6, p. 947-53, Jun 2002. ISSN 0002-953X

DIFRANZA, J. R.; GUERRERA, M. P. Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol*, v. 51, n. 2, p. 130-5, Mar 1990. ISSN 0096-882X

DIFRANZA, J. R. et al. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tob*

*Control*, v. 9, n. 3, p. 313-9, Sep 2000. ISSN 0964-4563

DIFRANZA, J. R. et al. Measuring the loss of autonomy over nicotine use in adolescents: the DANDY (Development and Assessment of Nicotine Dependence in Youths) study. *Arch Pediatr Adolesc Med*, v. 156, n. 4, p. 397-403, Apr 2002. ISSN 1072-4710

DIFRANZA, J. R. et al. Development of symptoms of tobacco dependence in youths: 30 month follow up data from the DANDY study. *Tob Control*, v. 11, n. 3, p. 228-35, Sep 2002. ISSN 0964-4563

DINAS, P. C.; KOUTEDAKIS, Y.; FLOURIS, A. D. Effects of active and passive tobacco cigarette smoking on heart rate variability. *Int J Cardiol*, v. 163, n. 2, p. 109-15, Feb 20 2013. ISSN 1874-1754

DUBAS, J. S. Cognitive abilities and physical maturation. 1991. Em R. M. Lerner, A. C. Petersen & J. Brooks-Gunn (Eds.), *Encyclopedia of Adolescence* (Vol. 1, pp. 133-138). New York: Garland.

DUFFING, T. M. et al. Stress, substance abuse, and addiction. *Curr Top Behav Neurosci*, v. 18, p. 237-63, 2014. ISSN 1866-3370

ECCLES, J. S. et al. Development during adolescence. The impact of stage-environment fit on young adolescents' experiences in schools and in families. *Am Psychol*, v. 48, n. 2, p. 90-101, Feb 1993. ISSN 0003-066X

EILAND, L.; ROMEO, R. D. Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience*, v. 249, p. 162-71, Sep 26 2013. ISSN 1873-7544

ENGELMANN, M.; LANDGRAF, R.; WOTJAK, C. T. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*, v. 25, n. 3-4, p. 132-49, Sep-Dec 2004. ISSN 0091-3022

ERWIN, B. A. et al. Traumatic and socially stressful life events among persons with social anxiety disorder. *J Anxiety Disord*, v. 20, n. 7, p. 896-914, 2006. ISSN 0887-6185

FIDLER, J. A.; WEST, R. Self-perceived smoking motives and their correlates in a general population sample. *Nicotine Tob Res*, v. 11, n. 10, p. 1182-8, Oct 2009. ISSN 1469-994X

FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*, v. 125, n. 1-2, p. 151-7, Nov 1 2001. ISSN 0166-4328

FILGUEIRAS, C. C. et al. Unilateral hemispherectomy at adulthood asymmetrically affects immobile behavior of male Swiss mice. *Behav Brain Res*, v. 172, n. 1, p. 33-8, Sep 15 2006. ISSN 0166-4328

FINCH, C. K.; ANDRUS, M. R.; CURRY, W. A. Nicotine replacement therapy-associated syndrome of inappropriate antidiuretic hormone. *South Med J*, v. 97, n. 3, p. 322-4, Mar 2004. ISSN 0038-4348

FLORY, K. et al. Alcohol and cigarette use and misuse among Hurricane Katrina survivors:

psychosocial risk and protective factors. *Subst Use Misuse*, v. 44, n. 12, p. 1711-24, 2009. ISSN 1532-2491

FOILB, A. R.; LUI, P.; ROMEO, R. D. The transformation of hormonal stress responses throughout puberty and adolescence. *J Endocrinol*, v. 210, n. 3, p. 391-8, Sep 2011. ISSN 1479-6805

FUXE, K. et al. Neuroendocrine actions of nicotine and of exposure to cigarette smoke: medical implications. *Psychoneuroendocrinology*, v. 14, n. 1-2, p. 19-41, 1989. ISSN 0306-4530

GALVAN, A. Adolescent development of the reward system. *Front Hum Neurosci*, v. 4, p. 6, 2010. ISSN 1662-5161

GALVAN, A. et al. Earlier development of the accumbens relative to orbitofrontal cortex might underlie risk-taking behavior in adolescents. *J Neurosci*, v. 26, n. 25, p. 6885-92, Jun 21 2006. ISSN 1529-2401

GILBERT, D. G. et al. Effects of smoking/nicotine on anxiety, heart rate, and lateralization of EEG during a stressful movie. *Psychophysiology*, v. 26, n. 3, p. 311-20, May 1989. ISSN 0048-5772

GOEDERS, N. E. A neuroendocrine role in cocaine reinforcement. *Psychoneuroendocrinology*, v. 22, n. 4, p. 237-59, May 1997. ISSN 0306-4530

GOLDMAN, L. et al. Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology*, v. 12, n. 3, p. 199-211, 1973. ISSN 0028-3835

GOODMAN, E.; CAPITMAN, J. Depressive symptoms and cigarette smoking among teens. *Pediatrics*, v. 106, n. 4, p. 748-55, Oct 2000. ISSN 1098-4275

GRANT, B. F.; HARFORD, T. C.; GRIGSON, M. B. Stability of alcohol consumption among youth: a National Longitudinal Survey. *J Stud Alcohol*, v. 49, n. 3, p. 253-60, May 1988. ISSN 0096-882X

HAMILTON, K. R. et al. Behavioral effects of nicotine withdrawal differ by genetic strain in male and female adolescent rats. *Nicotine Tob Res*, v. 12, n. 12, p. 1236-45, Dec 2010. ISSN 1469-994X

HUGHES, J. R.; STEAD, L. F.; LANCASTER, T. Anxiolytics and antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev*, n. 2, p. CD000031, 2000. ISSN 1469-493X

HUTTENLOCHER, P. R. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia*, v. 28, n. 6, p. 517-27, 1990. ISSN 0028-3932

INIGUEZ, S. D. et al. Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, n. 6, p. 1609-24, May 2009. ISSN 1740-634X

IPPOLITI, F.; CANITANO, N.; BUSINARO, R. Stress and obesity as risk factors in

cardiovascular diseases: a neuroimmune perspective. *J Neuroimmune Pharmacol*, v. 8, n. 1, p. 212-26, Mar 2013. ISSN 1557-1904

IRVINE, E. E.; CHEETA, S.; FILE, S. E. Development of tolerance to nicotine's anxiogenic effect in the social interaction test. *Brain Res*, v. 894, n. 1, p. 95-100, Mar 9 2001. ISSN 0006-8993

IRVINE, E. E. et al. Different treatment regimens and the development of tolerance to nicotine's anxiogenic effects. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 68, n. 4, p. 769-76, Apr 2001. ISSN 0091-3057

IWATA, M.; OTA, K. T.; DUMAN, R. S. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun*, v. 31, p. 105-14, Jul 2013. ISSN 1090-2139

JAGGI, A. S. et al. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci*, v. 32, n. 6, p. 993-1005, Dec 2011. ISSN 1590-3478

JANSEN, A. S. et al. Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. *Science*, v. 270, n. 5236, p. 644-6, Oct 27 1995. ISSN 0036-8075

JOHNSON, J. G. et al. Association between cigarette smoking and anxiety disorders during adolescence and early adulthood. *JAMA*, v. 284, n. 18, p. 2348-51, Nov 8 2000. ISSN 0098-7484

KAIDANOVICH-BEILIN, O. et al. Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp*, n. 48, 2011. ISSN 1940-087X

KANDEL, D. B.; LOGAN, J. A. Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: I. Periods of risk for initiation, continued use, and discontinuation. *Am J Public Health*, v. 74, n. 7, p. 660-6, Jul 1984. ISSN 0090-0036

KANDEL, D. B.; YAMAGUCHI, K.; CHEN, K. Stages of progression in drug involvement from adolescence to adulthood: further evidence for the gateway theory. *J Stud Alcohol*, v. 53, n. 5, p. 447-57, Sep 1992. ISSN 0096-882X

KASSEL, J. D.; UNROD, M. Smoking, anxiety, and attention: support for the role of nicotine in attentionally mediated anxiolysis. *J Abnorm Psychol*, v. 109, n. 1, p. 161-6, Feb 2000. ISSN 0021-843X

KIRSCHBAUM, C.; WUST, S.; STRASBURGER, C. J. 'Normal' cigarette smoking increases free cortisol in habitual smokers. *Life Sci*, v. 50, n. 6, p. 435-42, 1992. ISSN 0024-3205

KONRAD, K.; FIRK, C.; UHLHAAS, P. J. Brain development during adolescence: neuroscientific insights into this developmental period. *Dtsch Arztebl Int*, v. 110, n. 25, p. 425-31, Jun 2013. ISSN 1866-0452

KOOB, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci*, v. 13, n. 5, p. 177-84, May 1992. ISSN 0165-6147

- KOVAL, J. J.; PEDERSON, L. L. Stress-coping and other psychosocial risk factors: a model for smoking in grade 6 students. *Addict Behav*, v. 24, n. 2, p. 207-18, Mar-Apr 1999. ISSN 0306-4603
- KUTTLER, A. F.; LA GRECA, A. M. Linkages among adolescent girls' romantic relationships, best friendships, and peer networks. *J Adolesc*, v. 27, n. 4, p. 395-414, Aug 2004. ISSN 0140-1971
- LADER D. Smoking related behaviours and attitudes 2006. 2007. London: Office for National Statistics.
- LAL, H.; PRATHER, P. L.; REZAZADEH, S. M. Anxiogenic behavior in rats during acute and protracted ethanol withdrawal: reversal by buspirone. *Alcohol*, v. 8, n. 6, p. 467-71, Nov-Dec 1991. ISSN 0741-8329
- LAM, T. H. et al. Smoking and depressive symptoms in Chinese elderly in Hong Kong. *Acta Psychiatr Scand*, v. 110, n. 3, p. 195-200, Sep 2004. ISSN 0001-690X
- LAPIZ, M. D. et al. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci Behav Physiol*, v. 33, n. 1, p. 13-29, Jan 2003. ISSN 0097-0549
- LASSER, K. et al. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. *JAMA*, v. 284, n. 20, p. 2606-10, Nov 22-29 2000. ISSN 0098-7484
- LAWRENCE, D.; MITROU, F.; ZUBRICK, S. R. Smoking and mental illness: results from population surveys in Australia and the United States. *BMC Public Health*, v. 9, p. 285, 2009. ISSN 1471-2458
- LEE RIDNER, S.; STATEN, R. R.; DANNER, F. W. Smoking and depressive symptoms in a college population. *J Sch Nurs*, v. 21, n. 4, p. 229-35, Aug 2005. ISSN 1059-8405
- LESLIE, F. M. et al. Adolescent development of forebrain stimulant responsiveness: insights from animal studies. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1021, p. 148-59, Jun 2004. ISSN 0077-8923
- LEWIS, M. E. Carnivoran paleoguilds of Africa: implications for hominid food procurement strategies. *J Hum Evol*, v. 32, n. 2-3, p. 257-88, Feb-Mar 1997. ISSN 0047-2484
- L. HAND, W. FURMAN. Rewards and costs in adolescent other-sex friendships: comparison to same-sex friendships and romantic relationships. 2009. *Soc. Dev.*, 18, pp. 270-287
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987. ISSN 0033-3158
- MAGGS, J. L.; PATRICK, M. E.; FEINSTEIN, L. Childhood and adolescent predictors of alcohol use and problems in adolescence and adulthood in the National Child Development Study. *Addiction*, v. 103 Suppl 1, p. 7-22, May 2008. ISSN 0965-2140
- MARTINI, S.; WAGNER, F. A.; ANTHONY, J. C. The association of tobacco smoking and

depression in adolescence: evidence from the United States. *Subst Use Misuse*, v. 37, n. 14, p. 1853-67, 2002. ISSN 1082-6084

MATHEWS, I. Z.; MILLS, R. G.; MCCORMICK, C. M. Chronic social stress in adolescence influenced both amphetamine conditioned place preference and locomotor sensitization. *Dev Psychobiol*, v. 50, n. 5, p. 451-9, Jul 2008. ISSN 1098-2302

MATTHEWS, D. A. et al. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. I. Histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity. *Dev Biol*, v. 36, n. 1, p. 130-41, Jan 1974. ISSN 0012-1606

MCCORMICK, C. M. et al. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn*, v. 72, n. 1, p. 73-85, Feb 2010. ISSN 1090-2147

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*, v. 886, n. 1-2, p. 172-189, Dec 15 2000. ISSN 0006-8993

MCEWEN, B. S.. Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. *Metabolism*, v. 57 Suppl 2, p. S11-5, Oct 2008. ISSN 1532-8600

MCGEE, R. et al. Tobacco smoking in adolescence predicts maladaptive coping styles in adulthood. *Nicotine Tob Res*, v. 15, n. 12, p. 1971-7, Dec 2013. ISSN 1469-994X

MCWILLIAMS, J. R.; LYNCH, G. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science*, v. 221, n. 4610, p. 572-4, Aug 5 1983. ISSN 0036-8075

MENDELSON, J. H. et al. Effects of smoking successive low- and high-nicotine cigarettes on hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and mood in men. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 4, p. 749-60, Mar 2008. ISSN 0893-133X

MENDELSON, J. H. et al. Effects of low- and high-nicotine cigarette smoking on mood states and the HPA axis in men. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, n. 9, p. 1751-63, Sep 2005. ISSN 0893-133X

MICHL, L. C. et al. Rumination as a mechanism linking stressful life events to symptoms of depression and anxiety: longitudinal evidence in early adolescents and adults. *J Abnorm Psychol*, v. 122, n. 2, p. 339-52, May 2013. ISSN 1939-1846

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011. Disponível em:  
<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarNoticia&codConteudo=2143&codModuloArea=162&chamada=adolescentes-tem-facil-acesso-ao-cigarro>>  
Acessado em: 28 jun, 2013.

MONNIG, A. A.; PRITTIE, J. E. A review of stress-related mucosal disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, v. 21, n. 5, p. 484-95, Oct 2011. ISSN 1476-4431

NADLER, J. V. et al. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. II. Quantitative changes in choline acetyltransferase and acetylcholinesterase

activities. *Dev Biol*, v. 36, n. 1, p. 142-54, Jan 1974. ISSN 0012-1606

NELSON, D. E. et al. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *Am J Public Health*, v. 85, n. 1, p. 34-40, Jan 1995. ISSN 0090-0036

NEWHOUSE, P. A. et al. Neuroendocrine, physiologic, and behavioral responses following intravenous nicotine in nonsmoking healthy volunteers and in patients with Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology*, v. 15, n. 5-6, p. 471-84, 1990. ISSN 0306-4530

OJEDA, S. R. et al. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. *Mol Cell Endocrinol*, v. 324, n. 1-2, p. 3-11, Aug 5 2010. ISSN 1872-8057

O'LOUGHLIN, J. et al. The hardest thing is the habit: a qualitative investigation of adolescent smokers' experience of nicotine dependence. *Nicotine Tob Res*, v. 4, n. 2, p. 201-9, May 2002. ISSN 1462-2203

OUAGAZZAL, A. M.; KENNY, P. J.; FILE, S. E. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 144, n. 1, p. 54-60, May 1999. ISSN 0033-3158

PARROTT, A. C. Individual differences in stress and arousal during cigarette smoking. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 115, n. 3, p. 389-96, Jul 1994. ISSN 0033-3158

PARROTT, A. C. Smoking cessation leads to reduced stress, but why? *Int J Addict*, v. 30, n. 11, p. 1509-16, Sep 1995. ISSN 0020-773X

PARROTT, A. C. Does cigarette smoking cause stress? *Am Psychol*, v. 54, n. 10, p. 817-20, Oct 1999. ISSN 0003-066X

PARROTT, A. C. Cigarette-derived nicotine is not a medicine. *World J Biol Psychiatry*, v. 4, n. 2, p. 49-55, Apr 2003. ISSN 1562-2975

PASCO, J. A. et al. Tobacco smoking as a risk factor for major depressive disorder: population-based study. *Br J Psychiatry*, v. 193, n. 4, p. 322-6, Oct 2008. ISSN 1472-1465

PEDERSEN, W. C. et al. The impact of rumination on aggressive thoughts, feelings, arousal, and behaviour. *Br J Soc Psychol*, v. 50, n. Pt 2, p. 281-301, Jun 2011. ISSN 2044-8309

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270

PERKINS, K. A.; GROBE, J. E. Increased desire to smoke during acute stress. *Br J Addict*, v. 87, n. 7, p. 1037-40, Jul 1992. ISSN 0952-0481

PERVANIDOU, P.; CHROUSOS, G. P. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism*, v. 61, n. 5, p. 611-9, May 2012. ISSN 1532-8600



PETERSEN, A.C., SILBEREISEN, R.K. AND SOERENSON, S. Adolescent development: A global perspective. Em: Hurrelmann, K. and Hamilton, S.F. (Eds.) *Social Problems and Social Contexts in adolescence: Perspectives Across Boundaries*, Hawthorne, NY: Aldine de Gruyter, 1996. pp. 3-37.

PIAZZA, P. V. et al. Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Res*, v. 567, n. 1, p. 169-74, Dec 13 1991. ISSN 0006-8993

PICCIOTTO, M. R.; BRUNZELL, D. H.; CALDARONE, B. J. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, v. 13, n. 9, p. 1097-106, Jul 2 2002. ISSN 0959-4965

PICCIOTTO, M. R. et al. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, v. 391, n. 6663, p. 173-7, Jan 8 1998. ISSN 0028-0836

PIDOPLICHKO, V. I. et al. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*, v. 390, n. 6658, p. 401-4, Nov 27 1997. ISSN 0028-0836

PIERCE, J. P.; GILPIN, E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *Am J Public Health*, v. 86, n. 2, p. 253-6, Feb 1996. ISSN 0090-0036

POMERLEAU, O. F. Nicotine and the central nervous system: biobehavioral effects of cigarette smoking. *Am J Med*, v. 93, n. 1A, p. 2S-7S, Jul 15 1992. ISSN 0002-9343

POWELL, K. Neurodevelopment: how does the teenage brain work? *Nature*, v. 442, n. 7105, p. 865-7, Aug 24 2006. ISSN 1476-4687

PRINSTEIN, M. J.; LA GRECA, A. M. Childhood depressive symptoms and adolescent cigarette use: a six-year longitudinal study controlling for peer relations correlates. *Health Psychol*, v. 28, n. 3, p. 283-91, May 2009. ISSN 0278-6133

PROKHOROV, A. V. et al. Youth tobacco use: a global perspective for child health care clinicians. *Pediatrics*, v. 118, n. 3, p. e890-903, Sep 2006. ISSN 1098-4275

REPETTO, P. B.; CALDWELL, C. H.; ZIMMERMAN, M. A. A longitudinal study of the relationship between depressive symptoms and cigarette use among African American adolescents. *Health Psychol*, v. 24, n. 2, p. 209-19, Mar 2005. ISSN 0278-6133

RIBEIRO-CARVALHO, A. et al. Nicotine and ethanol interact during adolescence: effects on the central cholinergic systems. *Brain Res*, v. 1232, p. 48-60, Sep 26 2008. ISSN 0006-8993

RIBEIRO-CARVALHO, A. et al. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience*, v. 162, n. 4, p. 1174-86, Sep 15 2009. ISSN 1873-7544

RIBEIRO-CARVALHO, A. et al. Exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on depressive-like behavior during exposure and withdrawal. *Behav Brain Res*, v. 221,

n. 1, p. 282-9, Aug 1 2011. ISSN 1872-7549

RODGERS, R. J.; COLE, J. C.; TREDWELL, J. M. Profile of action of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists, ondansetron and WAY 100289, in the elevated plus-maze test of anxiety of mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 117, n. 3, p. 306-12, Feb 1995. ISSN 0033-3158

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 21, n. 6, p. 801-10, Nov 1997. ISSN 0149-7634

ROMEO, R. D. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Front Neuroendocrinol*, v. 31, n. 2, p. 232-40, Apr 2010. ISSN 1095-6808

ROMEO, R. D.; KARATSOREOS, I. N.; MCEWEN, B. S. Pubertal maturation and time of day differentially affect behavioral and neuroendocrine responses following an acute stressor. *Horm Behav*, v. 50, n. 3, p. 463-8, Sep 2006. ISSN 0018-506X

ROMEO, R. D.; MCEWEN, B. S. Stress and the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1094, p. 202-14, Dec 2006. ISSN 0077-8923

ROSE, J. E.; ANANDA, S.; JARVIK, M. E. Cigarette smoking during anxiety-provoking and monotonous tasks. *Addict Behav*, v. 8, n. 4, p. 353-9, 1983. ISSN 0306-4603

ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS. Nicotine Addiction in Britain, A report of the Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians. 2000. *Royal College of Physicians of London*, Royal College of Physicians of London.

RUTTER, M. Psychosocial influences: critiques, findings, and research needs. *Dev Psychopathol*, v. 12, n. 3, p. 375-405, Summer 2000. ISSN 0954-5794

SAITO, M. et al. Nicotine-induced sensitization in mice: changes in locomotor activity and mesencephalic gene expression. *Neurochem Res*, v. 30, n. 8, p. 1027-35, Aug 2005. ISSN 0364-3190

SAPOLSKY RM.. *Why Zebras Don't Get Ulcers*. 3ed. New York. Holt Paperbacks 2004.:

SCHEETZ, A. J.; CONSTANTINE-PATON, M. Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J*, v. 8, n. 10, p. 745-52, Jul 1994. ISSN 0892-6638

SLIKKER, W., JR. et al. Mode of action: disruption of brain cell replication, second messenger, and neurotransmitter systems during development leading to cognitive dysfunction--developmental neurotoxicity of nicotine. *Crit Rev Toxicol*, v. 35, n. 8-9, p. 703-11, Oct-Nov 2005. ISSN 1040-8444

SLOTKIN, T. A. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol Teratol*, v. 24, n. 3, p. 369-84, May-Jun 2002. ISSN 0892-0362

SNEDECOR GW, COCHRAN WG. *Statistical Methods*, 6a ed. Ames, IA: The Iowa State University Press. 1967.

SONNTAG, H. et al. Are social fears and DSM-IV social anxiety disorder associated with smoking and nicotine dependence in adolescents and young adults? *Eur Psychiatry*, v. 15, n. 1, p. 67-74, Feb 2000. ISSN 0924-9338

SOWELL, E. R. et al. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nat Neurosci*, v. 2, n. 10, p. 859-61, Oct 1999. ISSN 1097-6256

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 24, n. 4, p. 417-63, Jun 2000. ISSN 0149-7634

SPEAR, L. P.; BRAKE, S. C. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol*, v. 16, n. 2, p. 83-109, Mar 1983. ISSN 0012-1630

STEPTOE, A.; USSHER, M. Smoking, cortisol and nicotine. *Int J Psychophysiol*, v. 59, n. 3, p. 228-35, Mar 2006. ISSN 0167-8760

STEUBER, T. L.; DANNER, F. Adolescent smoking and depression: which comes first? *Addict Behav*, v. 31, n. 1, p. 133-6, Jan 2006. ISSN 0306-4603

STONE, E. A.; QUARTERMAIN, D. Greater behavioral effects of stress in immature as compared to mature male mice. *Physiol Behav*, v. 63, n. 1, p. 143-5, Dec 31 1997. ISSN 0031-9384

STROUD, L. R. et al. Stress response and the adolescent transition: performance versus peer rejection stressors. *Dev Psychopathol*, v. 21, n. 1, p. 47-68, Winter 2009. ISSN 1469-2198

SUNG, H. Y. et al. Cigarette smoking and serious psychological distress: a population-based study of California adults. *Nicotine Tob Res*, v. 13, n. 12, p. 1183-92, Dec 2011. ISSN 1469-994X

TRULLAS, R. et al. 1-aminocyclopropanecarboxylates exhibit antidepressant and anxiolytic actions in animal models. *Eur J Pharmacol*, v. 203, n. 3, p. 379-85, Oct 22 1991. ISSN 0014-2999

ULUSU, U. et al. Evidence for the role of nitric oxide in nicotine-induced locomotor sensitization in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 178, n. 4, p. 500-4, Apr 2005. ISSN 0033-3158

VAN DER DEEN, F. S. et al. The association between failed quit attempts and increased levels of psychological distress in smokers in a large New Zealand cohort. *BMC Public Health*, v. 11, p. 598, 2011. ISSN 1471-2458

VAZQUEZ, D. M.; AKIL, H. Pituitary-adrenal response to ether vapor in the weanling animal: characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on adrenocorticotropin secretion. *Pediatr Res*, v. 34, n. 5, p. 646-53, Nov 1993. ISSN 0031-3998

VLAHOV, D. et al. Consumption of cigarettes, alcohol, and marijuana among New York City residents six months after the September 11 terrorist attacks. *Am J Drug Alcohol Abuse*, v. 30, n. 2, p. 385-407, May 2004. ISSN 0095-2990

VLAHOV, D. et al. Sustained increased consumption of cigarettes, alcohol, and marijuana among Manhattan residents after september 11, 2001. *Am J Public Health*, v. 94, n. 2, p. 253-4, Feb 2004. ISSN 0090-0036

WALL, P. M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 25, n. 3, p. 275-86, May 2001. ISSN 0149-7634

WATKINS, S. S.; KOOB, G. F.; MARKOU, A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine Tob Res*, v. 2, n. 1, p. 19-37, Feb 2000. ISSN 1462-2203

WEBSTER, R. A.; HUNTER, M.; KEATS, J. A. Peer and parental influences on adolescents' substance use: a path analysis. *Int J Addict*, v. 29, n. 5, p. 647-57, Apr 1994. ISSN 0020-773X

WILKINS, J. N. et al. Nicotine from cigarette smoking increases circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 78, n. 4, p. 305-8, 1982. ISSN 0033-315

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Convenção quadro de controle do tabaco. Dia Mundial Sem Tabaco. 2004. Tabaco e Pobreza – Um Círculo Vicioso. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Problems Related to Alcohol Consumption. 2007. Second report. Geneva (WHO Technical Report Series, No. 944).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs220/en/>>, Acessado em 20 Jun, 2014.

YU, G.; CHEN, H.; SHARP, B. M. Amplified reacquisition of nicotine self-administration in rats by repeated stress during abstinence. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 231, n. 16, p. 3189-95, Aug 2014. ISSN 1432-2072

ZAHALKA, E. A. et al. Differential development of cholinergic nerve terminal markers in rat brain regions: implications for nerve terminal density, impulse activity and specific gene expression. *Brain Res*, v. 601, n. 1-2, p. 221-9, Jan 22 1993. ISSN 0006-8993