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

Bruno da Silva Gonçalves

Avaliação da influência dos perfis fenotípicos comportamentais de camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 sobre parâmetros associados aos padrões de consumo ao etanol e nicotina

Rio de Janeiro
2020

Bruno da Silva Gonçalves

Avaliação da influência dos perfis fenotípicos comportamentais de camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 sobre parâmetros associados aos padrões de consumo ao etanol e nicotina

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho

Coorientadora: Prof^{a}. Dra. Yael Abreu Villaça

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

G635 Gonçalves, Bruno da Silva.
Avaliação da influência dos perfis fenotípicos comportamentais de camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 sobre parâmetros associados aos padrões de consumo ao etanol e nicotina / Bruno da Silva Gonçalves.- 2020.
136 f.

Orientador:. Anderson Ribeiro Carvalho
Coorientadora: Yael Abreu Villaça

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

1. Etanol. 2. Nicotina – Teses. 3. Consumo de bebidas alcóolicas. 4. Ansiedade na adolescência – Teses. 5. Comportamento do adolescente - Efeitos de drogas. 6 Depressão mental – Teses I. Carvalho, Anderson Ribeiro. II. Villaça, Yael Abreu. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-053:613.81

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

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

_____ _____

Assinatura Data

Bruno da Silva Gonçalves

Avaliação da influência dos perfis fenotípicos comportamentais de camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 sobre parâmetros associados aos padrões de consumo ao etanol e nicotina

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

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020.

Coorientadora: Prof.ª Dra. Yael Abreu Villaça

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Paula Campello Costa Lopes

Universidade Federal Fluminense

_____

Prof.ª Dra. Viviane Younes Rapozo

Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

Espero que esse agradecimento sirva como forma de compartilhar, com todas as pessoas que se envolveram com esse projeto de doutorado, os méritos que me foram concedidos.

A começar Prof. Anderson Ribeiro, que me acompanha desde o mestrado, por ter me acolhido e me concedido a oportunidade de fazer o doutorado. Através de seu exemplo como orientador, você me ensinou que, às vezes, o maior obstáculo pode ser superar nossos próprios limites. Obrigado também por confiar no meu trabalho e ser companheiro durante todas as etapas do doutorado.

À CAPES, agradeço pelo período de bolsa concedida, sem a qual a conclusão deste estudo teria sido muito mais árdua.

Aos pesquisadores Claudio Filgueiras, Yael Villaça e Alex Manhães, pela disponibilidade e convite à reflexão. Sua contribuição tem sido importante desde o início da minha formação científica, tanto na carreira profissional como na vida.

Este trabalho é fruto do esforço da equipe do Laboratório de Neurofisiologia da UERJ, junto a qual eu tenho o privilégio de fazer parte. Agradeço em especial Jemima, André, Emily, Maria, Pedro e Camila, que colaboraram diretamente comigo nos experimentos. Vocês merecem todo meu carinho e respeito, por serem mais do que companheiros de trabalho.

À minha família, meu irmão Vitor e meus pais Francisco e Elenira, que mesmo sem terem claro o que era o meu trabalho, me apoiaram e acreditaram no caminho que escolhi seguir na profissão. Obrigado pelas demonstrações de amor incondicionais.

À minha namorada Raline, obrigado por acreditar em mim até mesmo quando eu duvidava. Cada dia dessa aventura fez mais sentido e foi mais feliz por você estar presente.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, bem como a equipe da Pós-graduação em Biociências e seus discentes, obrigado pelo empenho em possibilitar que eu fizesse meu trabalho e por me levar a refletir por pontos de vista diferentes do meu.

Obrigado amigos, que souberam me ouvir e compartilhar vivências que transformaram minha vida. Vocês tornaram esse momento, por mim considerado difícil, uma oportunidade de melhorar.

Aos camundongos utilizados, que desempenharam o papel mais importante, doando suas vidas involuntariamente ao projeto. Pequeninos, minhas sinceras desculpas a vocês. Estou em eterna dívida e farei o possível para honrar seu sacrifício.

RESUMO

GONÇALVES, Bruno da Silva. *Avaliação da influência dos perfis fenotípicos comportamentais de camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 sobre parâmetros associados aos padrões de consumo ao etanol e nicotina.* 2020. 136 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A dependência como problema de saúde pública e suas consequências na convivência social e saúde do indivíduo impulsionam investigações sobre os mecanismos neurais que contribuem para essa patologia. No presente estudo temos o objetivo de avaliar a influência dos perfis fenotípicos comportamentais nos parâmetros associados à susceptibilidade ao etanol e nicotina, como também nos padrões de consumo destas drogas em camundongos suíços e C57BL/6 na adolescencia e vida adulta. Os camundongos Suíços e C57BL/6 foram caracterizados de acordo com seu perfil fenotípico nos testes do campo vazado, labirinto de cruz elevado, sociabilidade de 3 câmaras, nado forçado e preferência por sacarose. Em seguida, os animais foram expostos ao teste de livre escolha entre soluções de etanol (10%) e água ou soluções de nicotina (10 µg/ml) e água. Nossos dados apontam diferenças marcantes entre adolescentes e adultos, onde os individuos adultos apresentaram maior consumo de etanol. Além disso, adolescentes possuem comportamento de busca pela novidade mais intenso, menor ansiedade e maior sociabilidade. Os resultados do estudo indicam que o perfil fenotípico em adolescentes está associado ao consumo destas drogas. A preferência pelo consumo de sacarose prediz consumo de etanol em ambas as cepas e de nicotina na cepa Suíça durante a adolescência. O comportamento social é relevante ao consumo de nicotina somente para a cepa Suíça, entretanto o seu papel foi dependente da fase da vida em que o indivíduo está exposto. Esses resultados indicam a importância de fatores genéticos nos comportamentos relacionados ao comportamento social e à resposta a recompensas naturais no estabelecimento do perfil de consumo de nicotina e etanol. Sugerimos ainda que a comparação entre dados presentes na literatura deve sempre observar a linhagem utilizada, assim como a determinação da linhagem a ser utilizada deve levar em consideração o objetivo do estudo em questão.

Palavras-chave: Etanol. Nicotina. Padrão de consumo. Suíço. C57BL/6. Atividade exploratória. Comportamento associado a ansiedade. Sociabilidade. Comportamento associado à depressão. Preferência por sacarore. Teste de livre escolha entre duas garrafas.

ABSTRACT

GONÇALVES, Bruno da Silva. *Evaluation of the influence of behavioral phenotypic profiles of adolescent and adult Swiss and C57BL/6 strains of mice on parameters associated with the consumption patterns to ethanol and nicotine.* 2020. 136 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The dependence as a public health problem and its consequences on the social coexistence and health of the individual stimulate investigations on the neural mechanisms that contribute to this pathology. In the present study, we aimed to evaluate the influence of behavioral phenotypic profiles on parameters associated with ethanol and nicotine susceptibility, as well as the patterns of drug consumption in Swiss and C57BL/6 mice in adolescence and adulthood. Swiss and C57BL/6 mice were characterized according to their phenotypic profile in the Open Field, Elevated Plus-Maze, Three-Chambered Social Approach, Forced Swim and Sucrose Preference tests. The animals were then submitted to the free choice test between ethanol (10%) and water solutions or nicotine (10 μg/ml) and water solutions. Our data point to striking differences between adolescents and adults, where adult indviduals had higher consumption of nicotine. In addition, adolescents show more intense novelty seeking behavior, reduced anxiety-like behavior and greater sociability. The results of the study indicate that the phenotypic profile of adolescents is associated with the consumption of these drugs. The preference for the consumption of sucrose predicts consumption of ethanol in both strains and nicotine in the Swiss strain during adolescence. Social behavior is relevant to nicotine consumption only for the Swiss strain, however its role was dependent on the stage of life in which the individual is exposed. These results indicate the importance of genetic factors in behaviors related to social behavior and the response to natural rewards in establishing the profile of nicotine and ethanol consumption. We also suggest that the comparison between data in the literature should always observe the strain used, as well as the determination of the strain to be used should take into account the objective of the study in question.

Keywords: Ethanol. Nicotine. Consumption pattern. Swiss. C57BL/6. Exploratory activity. Anxiety-like behavior. Sociability. Depressive-like behavior. Sucrose Preference. Two-Bottle Choice preference test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração representando a vista superior do equipamento utilizado no teste do campo vazado 31

Figura 2 – Fotografia em vista superior do labirinto em cruz elevado 32

Figura 3 – Fotografia do teste de sociabilidade 33

Figura 4 – Fotografia com visão lateral do recipiente preenchido com água utilizado para a realização do teste do nado forçado 34

Figura 5 – Gaiola preparada para o Teste de Preferencia à Sacarose 35

Figura 6 – Cálculo da preferencia no Teste de Preferencia à Sacarose 35

Figura 7 – Desenho experimental do Teste de Livre Escolha entre Duas Garrafas utilizando nicotina e água em animais adolescentes e adultos 38

Figura 8 – Desenho experimental do Teste de Livre Escolha entre Duas Garrafas utilizando etanol e água em animais adolescentes (PN40) 39

Figura 9 – Perfil de consumo de nicotina entre camundongos Suíços adolescentes e adultos com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por dose (A) ou por dia de experimento (B) 41

Figura 10 – Perfil de consumo de nicotina entre camundongos C57BL/6 adolescentes e adultos com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por dose (A) ou por dia de experimento (B) 42

Figura 11 – Comparação entre o perfil de consumo de nicotina entre cepas durante a adolescência (A e B) e idade adulta (C e D) com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por dose (A e C) ou por dia de experimento (B e D) 43

Figura 12 – Perfil de consumo de etanol entre camundongos Suíços adolescentes e adultos com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por concentração (A) ou por dia de experimento (B) 44

Figura 13 – Perfil de consumo de etanol entre camundongos C57BL/6 adolescentes

e adultos com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por concentração (A) ou por dia de experimento (B) 44
Figura 14 – Comparação entre o perfil de consumo de etanol entre cepas durante a adolescência (A e B) e idade adulta (C e D) com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por concentração (A e C) ou por dia de experimento (B e D) 45
Figura 15 – Perfil de comportamento de busca por novidade no teste do campo vazado entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 46
Figura 16 – Perfil de comportamento de sociabilidade no teste social das três câmaras entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 47
Figura 17 – Perfil de comportamento associado a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 48
Figura 18 – Número de *stretching* realizados para o braço aberto (A) e percentual de tempo de permanência no centro do aparelho (B) no teste do labirinto em cruz elevado entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 48
Figura 19 – Perfil de comportamento de busca por recompensa natural no teste de preferência pela sacarose entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6 49
Figura 20 – Perfil de comportamento no teste do nado forçado entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíço e C57BL/6 50
Figura 21 – Efeito da sociabilidade no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 56
Figura 22 – Efeito da sociabilidade no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 57
Figura 23 – Efeito da sociabilidade no consumo de etanol em animais da cepa Suíça

em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 58
Figura 24 – Efeito da sociabilidade no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 59
Figura 25 – Efeito da resposta à recompensa natural no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 60
Figura 26 – Efeito da resposta à recompensa natural no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 61
Figura 27 – Efeito da resposta à recompensa natural no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 62
Figura 28 – Efeito da resposta à recompensa natural no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 63
Figura 29 – Efeito dos níveis de busca por novidade no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 64
Figura 30 – Efeito dos níveis de busca por novidade no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 65
Figura 31 – Efeito dos níveis de busca por novidade no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 66

Figura 32 – Efeito dos níveis de busca por novidade no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 67
Figura 33 – Efeito da ansiedade no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 68
Figura 34 – Efeito da ansiedade no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 69
Figura 35 – Efeito da ansiedade no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 70
Figura 36 – Efeito da ansiedade no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 71
Figura 37 – Efeito do tempo de tomada de decisão no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 72
Figura 38 – Efeito do tempo de tomada de decisão no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 74
Figura 39 – Efeito do tempo de tomada de decisão no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 74
Figura 40 – Efeito do tempo de tomada de decisão no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de

avaliação (B e D) 75
Figura 41 – Efeito do comportamento de avaliação de risco no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 76
Figura 42 – Efeito do comportamento de avaliação de risco no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 77
Figura 43 – Efeito do comportamento de avaliação de risco no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 78
Figura 44 – Efeito do comportamento de avaliação de risco no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 79
Figura 45 – Efeito do comportamento de escalada no nado forçado no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 80
Figura 46 – Efeito do comportamento de escalada no nado forçado no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 81
Figura 47 – Efeito do comportamento de escalada no nado forçado no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 82
Figura 48 – Efeito do comportamento de escalada no nado forçado no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D) 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz de correlação geral dos comportamentos estudados considerando ambas as cepas 52

Tabela 2 – Matriz de correlação geral dos comportamentos estudados considerando a cepa C57BL/6 53

Tabela 3 – Matriz de correlação geral dos comportamentos estudados considerando a cepa Suíça 54

Tabela 4 – Comparações no consumo das drogas entre idades 85

Tabela 5 - Comparações nos comportamentos entre idades 87

Tabela 6 – Comparações na susceptibilidade de consumo entre idades 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT1A	Receptor 1A de serotonina
ANOVA	Análise de Variancia
ANOVAr	Análise de Variância com medidas repetidas
BA	Braço aberto do labirinto em cruz elevado
BF	Braço fechado do labirinto em cruz elevado
BZ	Receptor benzodiazepínico
CEUA	Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais
CV	Teste do Campo Vazado
ETOH	Grupo de animais expostos ao etanol
F	Razão de Fisher
FPLSD	*Fisher's protected least significant difference test*
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
NF	Teste de Nado Forçado
NIC	Grupo de animais expostos à nicotina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OX1R	Receptor 1 de orexina
OX2R	Receptor 2 de orexina
OXTR	Receptor de oxitocina
P	Valor de prova
P.A.	Para análise
PN	Dias de vida pós-natal
STC	Teste de Sociabilidade de Três Camaras
UERJ	Universidado do Estado do Rio de Janeiro
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
g	Grama
kg	Quilograma
h	Hora
°C	Graus celsius
µg	Micrograma
ml	Mililitro
mg	Miligrama
cm	Centímetro
m	Metro
+	Adição
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	**OBJETIVOS**	28
1.1	**Objetivo geral**	28
1.2	**Objetivos específicos**	28
2	**MATERIAL E MÉTODOS**	29
2.1	**Animais**	29
2.2	**Testes comportamentais**	29
2.2.1	Teste do Campo Vazado (Hole Board Test)	30
2.2.2	Teste do Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus-Maze Test)	31
2.2.3	Teste de Sociabilidade de Três Câmaras (Three-Chambered Social Approach Test)	32
2.2.4	Teste do Nado Forçado (Forced Swim Test)	33
2.2.5	Teste de Preferencia à Sacarose (Sucrose Preference Test)	34
2.3	**Critérios de formação dos grupos experimentais**	35
2.4	**Teste de Livre Escolha entre Duas Garrafas (Two Bottle Choice Test)**	36
2.4.1	Nicotina	36
2.4.2	Etanol	38
2.5	**Análise estatística**	40
3	**RESULTADOS**	41
3.1	**Perfil de consumo**	41
3.1.1	Consumo de nicotina em animais da cepa Suíça	41
3.1.2	Consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6	42
3.1.3	Comparação entre as cepas para consumo de nicotina	42
3.1.4	Consumo de etanol em animais da cepa Suíça	43
3.1.5	Consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6	44
3.1.6	Comparação entre as cepas para consumo de etanol	45
3.2	**Perfil comportamental**	45
3.2.1	Comportamento de busca pela novidade	46
3.2.2	Comportamento social	46
3.2.3	Comportamento associado a ansiedade e tomada de decisão	47

3.2.4 Comportamento associado a resposta a recompensas naturais 49
3.2.5 Comportamento associado ao teste do nado forçado 49
3.3 **Relação entre as variáveis comportamentais** 51
3.3.1 Formação dos grupos experimentais para análise da susceptibilidade ao consumo de drogas 55
3.4 **Estudo dos fenótipos comportamentais na susceptibilidade ao consumo das drogas** 55
3.4.1 Efeito da sociabilidade 55
3.4.2 Efeito da resposta a recompensa natural (consumo de sacarose) 59
3.4.3 Efeito do comportamento de busca pela novidade 63
3.4.4 Efeito do comportamento associado à ansiedade 67
3.4.5 Efeito do comportamento de tomada de decisão 71
3.4.6 Efeito do comportamento de avaliação de risco 75
3.4.7 Efeito do comportamento no teste do nado forçado 79
4 **DISCUSSÃO** 84
4.1 **Resumo dos resultados** 84
4.1.1 Comparações no consumo das drogas entre cepas e idade 84
4.1.2 Comparações nos comportamentos entre cepas e idade 85
4.1.3 Resumo de resultado da susceptibilidade de consumo 87
4.2 **Discussão da comparação entre cepas** 91
4.3 **Discussão da comparação entre idades** 91
4.4 **Animais menos sociáveis consomem mais nicotina** 92
4.5 **Animais adolescentes com alta resposta a recompensas naturais consomem mais etanol em ambas as cepas** 94
4.6 **Busca pela novidade e ansiedade possuem pouco ou nenhuma importância no consumo das drogas em nosso modelo** 95
4.7 **Diferenças no efeito do tempo de tomada de decisão entre os adolescentes das diferentes cepas no consumo de etanol** 99
4.8 **Adolescentes C57BL/6 com baixa avaliação de risco consomem mais etanol** 100
4.9 **Somente comportamento de "*coping* ativo" foi relevante em adultos no consumo de etanol e somente na cepa *inbred*** 104
CONCLUSÃO 106
REFERÊNCIAS 108

INTRODUÇÃO

A adolescência é um período de tempo crítico para o desenvolvimento cerebral quando ocorre maturação emocional, cognitiva e social (Dahl e Spear, 2004). 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). Destacam-se entre essas habilidades cognitivas: o amadurecimento do controle de impulsividade e previsão de consequências, devido ao desenvolvimento das áreas cerebrais responsáveis por essas funções (Casey *et al.*, 2005). Nesta fase, ocorrem novas experiências como a iniciação sexual e a experimentação de drogas, e este é um dos períodos em que o sistema nervoso encontra-se mais suscetível à interferência de agentes externos (Spear, 2000a).

O limite temporal da adolescência não possui fácil definição. Em geral, 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 mudanças associadas à adolescência podem ocorrer a partir do vigésimo dia de vida pós-natal (PN20) e as últimas modificações podem ocorrer até PN55. Em primatas não humanos, a adolescência geralmente ocorre 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 idades acima de 25 anos como “adolescência tardia” (Baumrind, 1987).

Embora em alguns comportamentos, a performance dos adolescentes seja semelhante à encontrada em animais adultos, adolescentes de várias espécies apresentam comportamentos diferenciados quando comparados a indivíduos mais jovens e mais velhos. De maneira geral, a adolescência é caracterizada por traços comportamentais como labilidade emocional, impulsividade e comportamento de risco que estão associadas com o aumento de vulnerabilidade para transtornos neuropsiquiátricas, incluindo doenças afetivas e dependência (Andersen, 2003; Arnett, 1999; Spear, 2000a; Teicher *et al.*, 2003; Volkow e Li, 2005; Wallace *et al.*, 2003). As alterações comportamentais observadas durante a adolescência são consistentes com a necessidade do adolescente de explorar novos domínios e estabelecer novas relações durante o processo de independência dos pais (Spear, 2002). O aumento do comportamento de risco é observado numa variedade de espécies e pode servir como oportunidade de explorar novos ambientes e situações, algo que aumenta a probabilidade de experimentação de comportamentos propícios à repetição, comumente associados ao uso de drogas.

Adolescência e uso de drogas

Alguns estudos sugerem a ocorrência de mudanças drásticas no desenvolvimento cerebral durante a adolescência que poderiam predispor um indivíduo a experimentar substâncias como álcool, drogas ilícitas e tabaco (Spear, 2000a; Laviola *et al.*; 1999; USDHHS, 1988). De fato, adolescentes são mais propensos a uma variedade de comportamentos de risco, incluindo o uso de drogas (Martin *et al.*, 2002) e apresentam probabilidade maior de experimentar drogas de abuso (Grant *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1995; Webster *et al.*, 1994) e desenvolver dependência quando comparados a indivíduos adultos (Maggs *et al.*, 2008). Apesar das causas que levam o adolescente a iniciar e dar continuidade ao consumo de drogas como tabaco e álcool não estarem ainda estabelecidas, sabe-se que a idade do primeiro contato com compostos psicoativos é crítica, havendo maior probabilidade de se passar do estágio de uso para abuso se o consumo tiver início durante a adolescência. Indivíduos que não iniciam o uso destas drogas durante a adolescência raramente iniciam o uso em idades posteriores (Chen e Kandel, 1995; Kandel e Logan, 1984).

Existem evidências que o inicio do uso de drogas está relacionado aos efeitos farmacológicos agudos, como o alívio da ansiedade ou stress e indução de um estado de euforia. Ambos, nicotina e etanol apresentam efeito de redução de ansiedade. O uso de álcool para o alívio da ansiedade, particularmente em situações sociais, foi descrito na hipótese de "redução de tensão" (Little, 2000). Em relação à nicotina, há relatos de propriedades ansiolíticas. Entretanto, estas propriedades têm sido observadas primariamente em indivíduos dependentes de nicotina, nos quais a droga pode agir prevenindo ou aliviando a ansiedade gerada pela retirada da droga (Little, 2000). Além disso, vários estudos indicam que o cérebro do adolescente é mais vulnerável ao reforço positivo gerado por drogas de abuso das drogas de abuso (Bjork *et al.*, 2010; Brook *et al.*, 2000). O desenvolvimento de modelos pré-clínicos (modelos animais) de exposição a drogas de abuso durante a adolescência tem sido extremamente interessante, pois permite a investigação destas questões (Dutra-Tavares *et al*., 2015; Abreu-Villaça *et al*., 2010, 2013a,b, 2015, 2017; Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2011; Barron *et al.*, 2005). De particular interesse, diversos estudos mostram que é na adolescência que frequentemente ocorre o primeiro uso das drogas mais comumente abusadas, o álcool e tabaco

(Carlini *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 1995; Webster *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1987; Kandel e Yamaguchi, 1985;).

Nicotina

O tabagismo é a principal causa de morte evitável e doenças em países em desenvolvimento. Anualmente, a nível mundial, são fumados aproximadamente 7 trilhões e 300 bilhões de cigarros por mais de 1 bilhão de fumantes, dos quais 80% vivem nos países em desenvolvimento (OMS, 2004; OPS-BM, 2000). No mundo, 12% de todas as mortes em adultos com 30 anos ou mais estão associadas ao tabaco (OMS, 2012). Segundo a OMS, nos próximos 30 anos o tabagismo será responsável por 10 milhões de mortes a cada ano e 70% delas ocorrerão em países em desenvolvimento (OMS, 2012; 1999).

A nicotina, principal componente psicoativo do tabaco, é um dos psicoestimulantes mais utilizados no mundo (Boutrel e Koob, 2004). Os cigarros são a fonte mais comum de nicotina e, com isso, estudos indicam que ações da nicotina são responsáveis pelas bases farmacológicas de dependência ao cigarro e a outras formas de exposição ao tabaco (Di Chiara, 2000; Royal College of Physicians, 2000; Stolerman e Shoaib, 1991; U.S. Department of Health and Human Services, 1988). O consumo de tabaco vem caindo ao longo dos anos, mas ainda atinge cerca de 8% dos adolescentes nos EUA 2018 (Cullen *et al*., 2018). Além disso, tem havido um aumento acelerado do consumo de produtos do tabaco de nova geração, como os cigarros eletrônicos, com usuários adolescentes chegando a alarmantes 21% em 2018 (Cullen *et al*., 2018; Miech *et al*., 2019). Estima-se que mais de seis milhões de crianças eventualmente irão morrer prematuras em decorrência de doenças relacionadas ao hábito de fumar somente nos Estados Unidos (American Lung Association, 2002; CDC, 1998).

Aproximadamente um terço da população mundial é constituída por fumantes e a maioria iniciou o hábito de fumar durante a adolescência (Mansvelder e McGehee, 2002). Estudos mostram que a probabilidade de parar de fumar na idade adulta diminui substancialmente quando o hábito de fumar é iniciado durante a adolescência (Klein *et al.*, 2004). Além disso, o início do consumo do cigarro 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, mais importante, parte dos fumantes adolescentes apresentam sintomas de dependência antes mesmo de se tornarem fumantes

diários, frequentemente com poucos dias de fumo ocasional (Di Franza *et al.*, 2000, 2002a, 2002b; O'Loughlin *et al.*, 2002).

Vários estudos em animais experimentais vêm demonstrando que o consumo de nicotina durante a adolescência produz alterações neurocomportamentais persistentes (Abreu-Villaça *et al.*, 2010; Oliveira-da-Silva *et al.*, 2009; Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2008; Abreu-Villaça *et al.*, 2003; Brielmaier *et al.*, 2007; Nolley e Kelley, 2007; Slawecki *et al.*, 2004; Slawecki e Ehlers, 2002; Trauth *et al.*, 2000). Além disso, a exposição à nicotina durante a adolescência, também resulta em mudanças da atividade neurofisiológica em adultos (Slawecki *et al.*, 2003). Recentes estudos utilizando roedores adolescentes expostos à nicotina proporcionam suporte neuroquímico e comportamental para a hipótese da adolescência como período crítico (Abreu-Villaça *et al.*, 2010; Oliveira-da-Silva *et al.*, 2009; Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2008; Abreu-Villaça *et al.*, 2003, Adriani *et al.*, 2002; Klein, 2001; Laviola *et al.*, 2003; Miao *et al.*, 1998).

Modelos animais têm ajudado a esclarecer essa associação entre a exposição ao tabaco, em especial a nicotina, e desordens de humor. Estudos sobre ansiedade tem demonstrado que a exposição a nicotina pode ter efeitos tanto ansiolíticos (Brioni *et al.*, 1993) como ansiogênico (Ouagazzal *et al.*, 1999), dependendo da idade e modelo de administração. Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a abstinência da nicotina durante a adolescência promoveu um efeito ansiogênico em camundongos fêmeas (Abreu-Villaça *et al.*, 2008), corroborando a ideia que fêmeas são mais susceptíveis aos efeitos da nicotina e que a ansiedade pode ser fator de fundamental importância na manutenção do hábito de fumar. Estudos animais também corroboram o efeito antidepressivo da nicotina (Suemaru *et al.*, 2006), como também que a abstinência de nicotina promove aumento do comportamento associado a depressão (Mannucci *et al.*, 2006). Da mesma forma, em um estudo do nosso grupo, a abstinência pela nicotina promoveu aumento do comportamento tipo depressivo em fêmeas (Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2011). Poucos trabalhos em biologia experimental têm se dedicado a descrever as alterações emocionais provocadas pela exposição a fumaça de cigarro e não somente a exposição a nicotina. Interessantemente, nosso grupo observou em um estudo recente que a exposição à tabaco com altos níveis de nicotina promoveram aumento de comportamento associado a ansiedade, enquanto que o aumento de comportamento associado a ansiedade só foram observados na abstinência de cigarros com baixos níveis de nicotina (Abreu-Villaça *et al.*, 2014). Este resultado indica que outros componentes, além da nicotina, tenham papel relevante nos efeitos do tabaco na geração de alterações emocionais.

Álcool

A Pesquisa Nacional sobre Abuso de Drogas e Saúde de 2007 relatou que aproximadamente 16% dos adolescentes com idades entre 12 e 17 anos eram usuários de etanol, com 10% desses adolescentes classificados como bebedores compulsivos (U.S. Department of Health and Human Services, 2008). Os dados do estudo Monitoring the Future mostram que a prevalência e o consumo excessivo de álcool em homens atingem os picos com idades entre 21 e 22 anos e depois diminuem linearmente durante a idade adulta (Bachman *et al.*, 1997). De acordo com esses achados, Grant *et al.* (2004) relataram que indivíduos com idades entre 18 e 29 anos exibem as maiores taxas de abuso e dependência de álcool. Uma série de estudos epidemiológicos demonstraram claramente que o uso de etanol durante o início da adolescência é um fator de risco para o desenvolvimento posterior da dependência do álcool (Ehlers *et al.*, 2010; Hicks *et al.*, 2010; Hingson *et al.*, 2008; Ehlers *et al.*, 2006; Grant, 1998; Grant e Dawson, 1997). Adolescentes que usam quantidades substanciais podem exibir uma variedade de sintomas de dependência ao álcool, incluindo evidências de tolerância, aumento progressivo de consumo, dificuldade em diminuir a quantidade de bebida ingerida e parar de beber (Pollock e Martin, 1999). Adicionalmente, uma vez dependentes, a frequência de recaída para adolescentes se aproxima daquela de adultos alcoolistas, apesar do tempo de abuso por adolescentes ser muito menor quando comparado com adultos (Brown, 1993).

O mecanismo pelo qual o consumo precoce de álcool leva a um aumento do risco de dependência de álcool em indivíduos de alto risco não é conhecido. Alguns autores relatam que os níveis de stress são um dos fatores que podem predizer o uso e abuso de álcool e outras drogas por humanos adolescentes (Baer *et al.*, 1987; De Wit *et al.*, 1999; Deykin *et al.*, 1987; Johnson e Pandina, 1993; Tschann *et al*., 1994; Wills, 1986). Outra possibilidade é que os adolescentes podem exibir insensibilidade a algumas consequências negativas decorrentes ao uso de álcool, durante e após o consumo. Uma hipótese sugere que o consumo intensivo de álcool pode interromper o curso normal do desenvolvimento social e cognitivo, levando a um aumento do risco de várias patologias, incluindo toxicodependência (De Wit *et al.*, 2000; York, 1999). Uma hipótese alternativa é que os adolescentes que iniciam o consumo de álcool durante o início da adolescência podem ter uma predisposição subjacente a comportamentos desinibidores que impulsionam seu consumo inicial de álcool, bem como outras ações arriscadas (Iacono *et al.*, 2002; Jessor e Jessor, 1977).Essas hipóteses são difíceis de distinguir em estudos humanos, no entanto, o desenvolvimento de modelos animais para estudar os perfis

comportamentais do adolecente sobre a susceptibilidade aos efeitos da exposição do etanol poderia ser útil na compreensão dos fatores de risco para o consumo de álcool na adolescência, tanto como, sugerir mecanismos cerebrais subjacentes a formação dos grupos de risco.

O período de adolescência em roedores tem uma série de semelhanças com a condição humana, tornando-o um modelo razoável para estudar susceptibilidade ao consumo de álcool (Spear e Varlinskaya, 2005; Spear, 2000a,b). Os estudos que investigam as diferenças de desenvolvimento nos padrões de consumo de álcool indicam que os ratos adolescentes apresentam maiores níveis de ingestão de etanol quando comparados com ratos adultos (Brunell e Spear, 2005; Doremus *et al.*, 2005; Fabio *et al.*, 2014; Sarviharju *et al.*, 2001; Spear, 2004, 2007; Vetter *et al.*, 2007; Vetter-O'Hagen *et al.*, 2009). Estudos utilizando modelos animais também indicaram que o consumo voluntário de etanol durante a adolescência pode, em alguns modelos, ser mostrado para facilitar a aquisição de auto-administração de álcool, aumentar o comportamento de desejo e/ou aumentar a probabilidade de recidiva nesses animais na idade adulta (Alaux-Cantin *et al.*, 2013; Gilpin *et al.*, 2012; Jeanblanc *et al.*, 2015; McBride *et al.*, 2005; Serlin e Torregrossa, 2015; Spear, 2000c; Toalston *et al*., 2015). Além disso, estudos demonstram que animais experimentais que são geneticamente mais suscetíveis a consumir etanol voluntariamente podem rapidamente auto-administrar etanol durante a adolescência, mas que características do meio também influenciam o consumo (Barron *et al*., 2005). Similarmente, tem sido demonstrado que fatores genéticos e epigenéticos influenciam o desenvolvimento do alcoolismo em humanos (Barron *et al*., 2005).

Modelos Animais e suas linhagens

Modelo animal pode ser definido como um produto experimental desenvolvido em determinada espécie com o propósito de estudar fenômenos que ocorrem em outra espécie (McKinney, 1984; Ferreira *et al*., 2005). Segundo Fagundes e colaboradores (2004), um modelo deve ter características suficientes para ser semelhante ao objeto imitado e ter a capacidade de ser manipulado sem as limitações do objeto imitado. No caso de modelos animais de doenças humanas, eles se tornam válidos quando apresentam as mesmas estruturas envolvidas no comportamento ou na patologia em estudo, ou seja, devem ser o mais semelhante possível ao que se deseja estudar (Kaplan, 1973; Hochman *et al*., 2004; Fagundes *et al*., 2004; Massironi, 2012). Como exemplo, modelos animais podem ser como resultado de mutações, espontâneas

ou induzidas, que levam a uma alteração fenotípica em decorrência de um produto proteico não funcional ou ausente. Uma grande quantidade desses mutantes apresenta fenótipos que se assemelham fortemente àqueles observados em certas doenças humanas, podendo essas homologias se estender ao nível molecular (Godard, 2008).

O desenvolvimento de drogas terapêuticas eficazes pode vir a ocorrer através do uso de modelos animais que desenvolvam patologias semelhantes às desenvolvidas em humanos, desde que se consiga identificar os alvos e as vias bioquímicas e fisiológicas envolvidas nos mecanismos de ação comuns à patologia estudada (Moore, 1999). Entre as diferentes espécies animais utilizados na experimentação biomédica, o camundongo é amplamente estudado (Andersen *et al*., 2004; Abramov *et al*., 2008; Arndt *et al*., 2009; Koike *et al*., 2009).

Desde o século XVII os camundongos são utilizados em experimentação, havendo um grande desenvolvimento no estudo de sua genética a partir do século XX, quando Haldane publicou o primeiro mapa genético do camundongo (*apud* Massironi, 2012). Tal fato desencadeou um grande aumento no número de pesquisas utilizando esta espécie, que na verdade vem aumentando até hoje. Sendo assim, o emprego do camundongo tornou-se usual, passando a dominar completamente as práticas experimentais (Andersen *et al*., 2004). Dentre as características que o tornam adequado ao uso nas pesquisas científicas, podemos citar o tamanho corporal, a docilidade, a facilidade de manuseio, a prolificidade e o ciclo de vida curto, que possibilita a experimentação, o acompanhamento das pesquisas realizadas por várias gerações em curto período de tempo e em espaço reduzido, além da similaridade biológica que o aproxima do ser humano (Willner, 1991a). O sequenciamento completo do genoma de camundongos foi publicado em 2002. Depois do homem, o camundongo é o mamífero que possui o genoma mais bem estudado e conhecido (Waterston *et al*., 2002).

Rotineiramente, cientistas de todo o mundo usam diferentes linhagens de roedores para uma variedade de propósitos. Modelos de ratos de cepas distintivas são intensamente utilizados para estudar primordialmente doenças humanas. Quanto à classificação genética das linhagens de camundongos utilizados em pesquisa, podemos dividi-los em linhagens que resultam de acasalamentos entre irmãos (*inbred*), são chamados de isogênicos, enquanto colônias provenientes de acasalamentos ao acaso (*outbred*), são ditos heterogenéticos (Massinori, 2009). Os camundongos cruzados aleatoriamente, denominados *outbred*, formam lotes de camundongos não definidos geneticamente, estas colônias são mais fáceis de criar em função do vigor híbrido, apresentando frequência de acasalamentos produtivos próxima a 100% (Massironi, 2009). As colônias de camundongos *outbred* são úteis, por exemplo, em pesquisas

nas quais o genótipo do animal não precisa ser conhecido. Uma das colônias de camundongos *outbred* mais utilizadas é a Suiça (Massironi, 2009).

Uma linhagem isogênica é produzida pelo cruzamento entre irmãos, por 20 ou mais gerações. Exceto pela diferença sexual, os camundongos de uma mesma linhagem isogênica são identicos, dentro do geneticamente possível. A vantagem na sua utilização se traduz no fato que a padronização de linhagens isogênicas reduz possíveis variações em resultados experimentais devido ao seu padrão genético, permitindo assim a utilização de um número menor de animais para que seja alcançado o poder estatístico necessário. As linhagens isogênicas apresentam características que as diferem umas das outras e, ao mesmo tempo, uniformidade fenotípica e genética entre os indivíduos de uma mesma linhagem, o que implica em variações experimentais restritas a fatores externos sem a influência da genética do animal (Andersen *et al*., 2004; Benavides e Guénet, 2003; Casellas, 2010; Knight e Abbot, 2002). Assim, cada linhagem isogênica tem um leque de características particulares como o tipo de tumores espontâneos, produção de leite, habilidade para aprender, agressividade, susceptibilidade a agentes infecciosos, entre outras, que tornam a sua escolha essencial para o desenho experimental e para a obtenção de resultados confiáveis (Benavides e Guénet, 2003). Atualmente, mais de 90% dos trabalhos científicos publicados em todas as áreas usam linhagens isogênicas (Massinori, 2009).

As duas linhagens de camundongos mais usadas na pesquisa em neurociência comportamental são a Suíça e a C57BL/6. Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas têm sido sujeitos a muitas investigações comportamentais semelhantes à ansiedade, uma vez que é um fundo comum para camundongos transgênicos (Paylor e Crawley, 1997; Tarantino *et al*., 2000; Brooks *et al*., 2004, 2005; Mineur *et al*., 2006). Camundongos suíços têm sido amplamente utilizados para pesquisas biomédicas em uma série de protocolos que investigam a emotividade (Kawakami *et al*., 2010) e como sujeitos de pesquisas farmacológicas (Ribeiro e De Lima, 2002; Texeira *et al*., 2004; Klein *et al*., 2014; Galdino *et al*., 2015). Camundongos suíços e C57BL/6 também têm sido usados para estudar transtornos de humor, assim como comportamento depressivo (Martin e Brown, 2010; Costa *et al*., 2013; Zhu *et al*., 2014). Os parâmetros comportamentais diferem enormemente entre as diferentes linhagens isogênicas e tal aspecto tem sido utilizado como ferramenta para se investigar os fatores genéticos subjacentes a estes comportamentos (Tarantino *et al*., 2000). Entretanto, poucos trabalhos comparam parâmetros comportamentais e fisiológicos entre linhagens heterogênicas e isogênicas.

Modelos Animais de Dependência/Adição

Como dito anteriormente, adolescentes divergem em comportamento com indivíduos mais jovens e mais velhos. Estudos com roedores demonstram que adolescentes apresentam diferenças quando comparados com adultos em relação a medidas de ansiedade, depressão e reatividade ao stress (Adriani e Laviola, 2004; Slawecki, 2005). Ratos adolescentes podem exibir níveis menores ou maiores de ansiedade em análises comportamentais quando comparados com adultos (Cheeta *et al*., 2001; Doremus *et al*., 2003; Elliott *et al*., 2005; Genn *et al*., 2003; Imhof *et al*., 1993; Primus e Kellog, 1989; Slawecki, 2005; Walker *et al*., 2004), apresentam níveis elevados de busca pela novidade (Adriani *et al*., 1998), impulsividade (Adriani e Laviola, 2003) e comportamento de risco (Macri's *et al*., 2002), bem como redução de resposta ao estresse (Adriani e Laviola, 2000). Ratos adolescentes exibem aumento no comportamento exploratório e na busca de novidade em relação a ratos em outras idades (Spear *et al*., 1980; Spear, 2000). Além disso, adolescentes são mais propensos a comportamentos de risco, como o uso de drogas (Martin *et al*., 2002).

O desenvolvimento de modelos animais de exposição a drogas de abuso durante a adolescência tem sido extremamente interessante, pois permite diversas investigações como, por exemplo, os mecanismos cerebrais subjacentes aos efeitos do consumo precoce em adolescentes (Barron *et al*., 2005). Em geral, estudos com esses modelos visam dois objetivos principais. O primeiro deles visa estudar as conseqüências do uso crônico das drogas, incluindo o desenvolvimento de tolerância/sensibilização e a dependência física/síndrome de abstinência. Nesses modelos, a droga é administrada pelo pesquisador de maneira forçada através da dieta, ou de intubação gástrica, ou por injeção e até mesmo por inalação. O segundo objetivo, de particular interesse para o presente projeto, visa estudar no animal o comportamento de procura à droga. Os modelos de comportamento de procura à droga tentam demonstrar as propriedades reforçadoras das drogas, as quais se acredita desempenhem um papel central no desenvolvimento da dependência (Spanagel, 2000; Meisch, 2001). Os modelos animais desenvolvidos até o momento para estudar dependência de drogas podem ser classificados em três grupos: modelos que estudam as propriedades reforçadoras positivas, modelos que estudam as propriedades reforçadoras negativas e modelos que tentam mimetizar aspectos diferentes da adição, como o uso compulsivo (fissura), a recaída e a perda do controle sobre o uso (Spanagel, 2000; Colombo *et al*., 2004; Ginsburg e Lamb, 2013). Várias abordagens experimentais têm

sido empregadas nestes modelos, entre elas a autoadministração por livre escolha (Ahmed e Koob, 1998; Ahmed e Koob, 1999; Ahmed *et al*., 2000; Roberts *et al*., 2000).

Autoadministração por livre escolha

As drogas de abuso funcionam como estímulos reforçadores positivos, sendo essa sua propriedade o conceito principal para a auto-administração das drogas. Duas abordagens para o estudo da auto-administração das drogas são empregadas: a preferência oral e o comportamento operante. Na primeira abordagem, os animais têm, em suas gaiolas, livre acesso à droga e escolhem livremente entre água e uma ou várias soluções contendo diferentes concentrações de droga. Normalmente, os animais devem escolher entre duas garrafas, uma contendo a droga, que pode ser adoçada ou não, e a outra contendo uma solução sem a droga. Quando é dada aos animais uma escolha entre soluções, a proporção de droga ingerida em relação ao consumo total de líquidos (razão de preferência) é usada para caracterizar a preferência pela droga (Cunningham *et al*., 2000).

Uma variação nesse modelo de auto-administração consiste, após um período prolongado de livre acesso à droga, em uma fase de privação onde os animais permanecem abstinentes por alguns dias ou até semanas, de acordo com o protocolo usado. Em seguida, todas as soluções contendo droga são então novamente oferecidas (Spanagel e Hölter, 2000; Spanagel, 2000). A reapresentação das soluções da droga leva a um aumento temporário no seu consumo e na preferência que é chamado de efeito da privação da droga. Nessa fase, os animais consomem quantidades maiores das soluções da droga, assim como ocorre uma alteração no ciclo diário normal dos animais, que passam a ingerir a droga durante a fase clara do dia, na qual os animais costumam permanecer mais inativos. Esse modelo de preferência é mais utilizado para o estudo do álcool, inclusive tem sido usado como base para seleção genética entre animais que preferem e os que não preferem o álcool (Li, 2000), mas também estudos usando cocaína (Jentsch *et al.*, 1998).

Nos experimentos, as garrafas podem estar disponíveis 24 horas por dia (livre escolha) (Cabral *et al*., 2006; Bonassoli *et al*., 2011; Pisu *et al*., 2011), ou apenas em curtos períodos do dia (acesso limitado) (Sinnot *et al.*, 2002). Entretanto, roedores submetidos a testes de consumo por livre escolha de etanol, a partir da técnica de fade out sacarose, raramente consomem mais de 2 g/kg/dia dessa substância (Heilig e Koob, 2007). Essa pequena concentração não atinge

uma alcoolemia necessária para gerar sinais de abstinência (Heilig e Egli, 2006), parâmetro relevante para análise da dependência (Heilig e Koob, 2007), embora tenha sido demonstrado que o baixo consumo de álcool foi suficiente para induzir alterações comportamentais em ratos, como a agressão (Van Erp e Miczek, 1997).

Como o etanol e a nicotina tem um sabor estranho para os animais, é normal eles terem um pouco de receio ao experimentar e consumir a substância, fenômeno denominado neofobia. Com isso, os pesquisadores têm adaptado estratégias de introduzir o álcool/nicotina em baixas concentrações, misturando sacarose ou sacarina (substâncias açucaradas com sabor palatável), e ao longo do tempo aumentar as concentrações de álcool gradualmente reduzindo a do açúcar (processo conhecido como *fade in* etanol *fade out* sacarose) (Cunningham *et al.*, 2000; Simms *et al.*, 2010; Villas Boas *et al.*, 2012). A limitação desse tipo de modelo é que não se pode dizer que o fato do animal preferir a droga signifique que ele esteja dependente. Apenas é possível interpretar que o animal procura a droga quer seja por suas propriedades reforçadoras positivas. A progressão do uso experimental de uma substância de abuso para a dependência depende de vários fatores de proteção e risco, que envolvem aspectos neurobiológicos, comportamentais e sociais (O'Brien, 2006). Neste contexto os fatores determinantes interagem de forma complexa no sentido de aumentar ou diminuir vulnerabilidade do indivíduo para o desenvolvimento da dependência (Laranjeiras e Ribeiro, 2006).

Sabe-se que um grande número de pessoas experimenta drogas com potencial de abuso. Algumas delas passam a consumir drogas ocasionalmente, porém apenas uma parte destes indivíduos adquire dependência (Lende e Smith, 2002; Vanyukov *et al.*, 2003). Na maioria dos países, o consumo de álcool e de outras drogas é comum e o abuso delas é crescente. Atualmente, o grande desafio na pesquisa psiquiátrica consiste na identificação de fatores biológicos e ambientais de risco, ou de proteção, para a vulnerabilidade ao desenvolvimento de dependência. Vale ressaltar que a intensa busca pela novidade tem sido associada a um maior consumo de drogas de abuso (Abreu-Villaça *et al.*, 2006; Spear, 2000). Em humanos, estudos têm encontrado forte correlação entre níveis elevados de busca por sensações novas e uso de drogas, incluindo nicotina (Zuckerman, 1994), cuja a dependência tem sido associada a altos níveis de impulsividade (Mitchell, 1999; Poulos *et al.*, 1998). Por exemplo, camundongos adolescentes que demonstram maior busca pela novidade, considerando seu comportamento no teste do campo vazado, consomem mais nicotina do que aqueles que demonstram menor busca pela novidade (Abreu-Villaça *et al.*, 2006), o que sugere que níveis elevados de busca por novos estímulos podem contribuir significativamente para o uso e abuso de drogas durante a adolescência.

Assim, considerando que: 1º) O uso abusivo de álcool é atualmente classificado como o terceiro principal fator de risco para patologias e incapacidade no mundo; 2º) 61,7% da população mundial com 15 anos ou mais de idade já ingeriram bebidas alcoólicas; 3º) o tabaco é uma das drogas mais consumidas no mundo; 4º) mais de 90% dos fumantes iniciam o hábito durante a adolescência; no presente projeto propomos testar o papel dos perfis fenotipicos em comportamentos associados à ansiedade, depressão, sociabilidade, atividade exploratória e preferência a sacarose nas alterações em parâmetros associados a susceptibilidade e os padrões de consumo de etanol e nicotina em camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíça e C57BL/6. Desta forma, caracterizar em modelo animal quais fenótipos comportamentais em adolescentes são relevantes na susceptibilidade ao uso destas drogas e, assim, estudar os mecanismos que podem estar envolvidos neste processo.

1. **OBJETIVOS**

1.1. **Objetivo geral:**

Avaliar se os perfis fenotípicos exibidos em testes comportamentais (Campo Vazado, Labirinto em Cruz Elevado, Sociabilidade em Três Câmaras e Nado Forçado) influenciam parâmetros associados à susceptibilidade ao etanol e nicotina, como também, nos padrões de consumo destas drogas em camundongos adolescentes e adultos.

1.2. **Objetivos específicos:**

- Avaliar o papel do comportamento associado a ansiedade;
- Avaliar o papel do comportamento de busca por recompensas naturais;
- Avaliar o papel do comportamento de busca por novidades;
- Avaliar o papel do comportamento de tomada de decisão;
- Avaliar o papel do comportamento de avaliação de risco;
- Avaliar o papel do comportamento de perseverança em situações aversivas.

2. **MATERIAIS E MÉTODOS**

2.1. **Animais**

Foram utilizados neste estudo 140 camundongos da cepa Suíça e 133 camundongos da cepa C57BL/6, criados e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro em um ciclo diário de 12 horas claro/escuro (onde o período escuro inicia a partir de 13 h), com temperatura controlada e mantida em torno de 21ºC, e livre acesso à água e comida. Os experimentos descritos abaixo foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e estam 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.

Os animais progenitores foram agrupados em caixas com um macho e duas fêmeas. Assim que a gravidez foi detectada, a fêmea grávida foi individualizada e acompanhada diariamente para determinação do dia do nascimento, que é considerado o primeiro dia pós-natal (PN1). Ao completar 25 dias de vida pós-natal (PN25), os animais foram desmamados e separados por sexo, sendo organizado em 5 animais por caixa, no máximo.

2.2. **Testes comportamentais**

Para traçar o perfil fenotipico comportamental dos animais em estudo, cada animal foi submetido a uma serie de 3 dias de testes comportamentais: Teste do Campo Vazado e Teste do Labirinto em Cruz Elevado no 1° dia; Teste de Sociabilidade em Três Câmaras e Teste do Nado Forçado no 2º dia; e Teste da Preferência à Sacarina, com duração de 24 h e iniciado logo após ao Teste do Nado Forçado. O inicio dessa bateria de testes comportamentais variou de acordo com o periodo etário avaliado, podendo ser iniciado em PN40, para investigação do perfil na adolescencia; ou PN120, para investigação do perfil na idade adulta. O horário para a realização do teste comportamental, bem como o local de realização destes, foram os mesmos

utilizados em todas as idades estudadas. Além disso, os animais foram ambientados na sala de testes por 10 minutos antes do início de cada teste.

Como descrito em detalhes nos próximos tópicos, a mediana dos dados obtidos em cada teste comportamental foi utilizada como ponto de corte entre animais considerados com baixa e alta expressão do fenótipo associado a cada teste. A subdivisão dos animais com base no fenótipo foi utilizada para avaliar se o dado fenótipo era determinante da susceptibilidade ao etanol e nicotina. Para tanto, no dia seguinte ao termino dos testes comportamentais (PN42 para os adolescentes e PN122 para os adultos), os camundongos de diferentes fenótipos foram submetidos a outro teste: o teste de livre escolha entre 2 garrafas.

2.2.1. Teste do Campo Vazado (*Holeboard Test*)

O teste do Campo Vazado (CV) é utilizado para avaliar os níveis de busca por novos estímulos ("busca por novidade") (File, 2001). O aparelho consiste em uma caixa retangular branca de polipropileno (30 cm x 38 cm x 17 cm), cujo chão é dividido em 16 retângulos (7,5 cm x 9,5 cm), sendo 12 periféricos e 4 centrais, e no centro de cada um deles há um buraco de 1,5 cm de diâmetro (Figura 1).

No início do teste, cada animal é colocado no centro da caixa, onde é permitido explorar o espaço e os orifícios livremente. Cada teste dura 5 minutos. Após o término de cada teste, o CV foi limpo com água com o intuito de eliminar as excretas e minimizar odores que podem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados. Todos os testes foram gravados por uma câmera para posterior análise. Os testes foram realizados na fase clara, entre 9 h e 11 h.

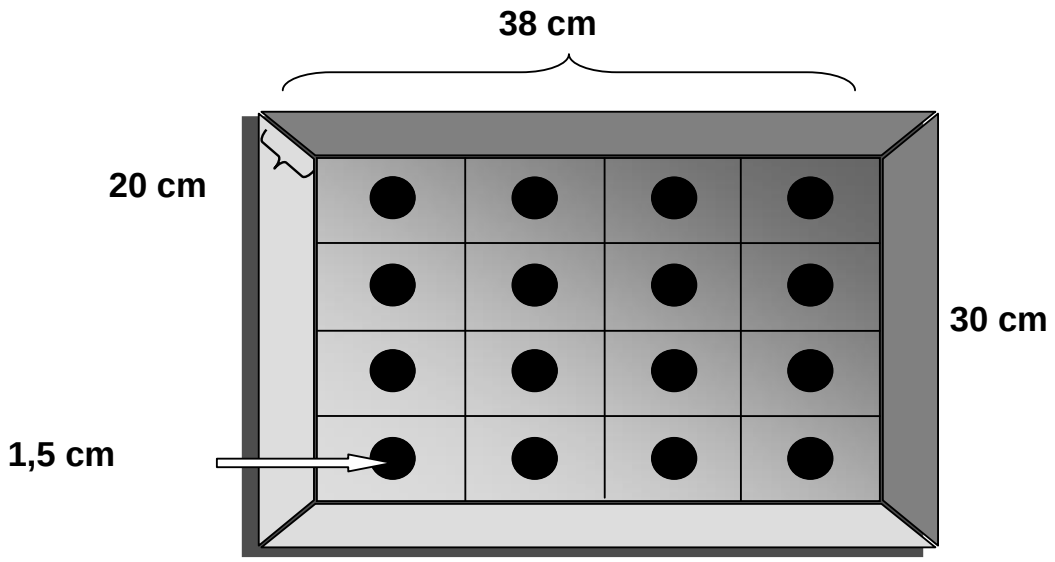

Figura 1 – Ilustração representando a vista superior do equipamento utilizado no teste do campo vazado.

A variável avaliada foi o número de vezes que os animais colocaram o focinho nos orifícios do centro e da periferia (número de orifícios explorados), usado como medida de busca por novidade (Abreu-Villaça *et al.*, 2006).

2.2.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze Test*)

O teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos testes comportamentais mais utilizados para se quantificar os níveis de ansiedade em animais experimentais (Carobrez e Bertoglio, 2005). O LCE foi validado para uso em espécies de roedores, como camundongos (Lister, 1987) e ratos (Pellow *et al.*, 1985). As expressões comportamentais demonstradas no teste do LCE representam uma combinação de comportamentos exploratórios e de esquiva, bem como de atividade geral (Carobrez e Bertoglio, 2005).

O LCE utilizado é um aparelho de acrílico de cor cinza, com formato em cruz e consiste em 2 braços abertos (sem paredes, 28,5 cm x 5 cm) e dois braços fechados (com paredes 28,5 cm x 5 cm x 14 cm) perpendiculares entre si e elevados 50 cm acima do chão (Figura 2).

Figura 2 – Fotografia em vista superior do labirinto em cruz elevado. Os braços na horizontal são os chamados braços fechados (BF). Os braços na vertical são os chamados braços abertos (BA).

Os camundongos foram colocados individualmente no centro do equipamento, permitindo que explorem o labirinto por 5 minutos. Os testes foram realizados entre 8 h e 13 h. Após o término de cada teste, o labirinto foi higienizado com um pano umedecido com água com o intuito de eliminar as excretas e minimizar odores que podem interferir no comportamento dos animais seguintes a serem testados. Todos os testes foram gravados por uma câmera digital de vídeo posicionada a 1 m acima do labirinto para análise posterior, sendo o percentual de tempo de permanência nos braços abertos, e o percentual de entradas nos braços abertos, usados como medidas de ansiedade (Elliott *et al.*, 2004; Fernandes e File, 1996; Hogg, 1996; Rodgers e Dalvi, 1997).

2.2.3. Teste de Sociabilidade em Três Câmaras (*Three-Chambered Social Approach Test*)

O teste de Sociabilidade em Três Câmaras (STC) tem sido empregado com sucesso para estudar comportamento social em roedores (Kaidanovich-Beilin *et al.*, 2011). O teste é baseado na livre escolha de um roedor em 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 aparato do STC consiste de uma caixa de acrílico transparente (20 cm x 22,5 cm x 40 cm), dividida em três câmaras de tamanhos iguais, separadas por duas portas de correr (Figura

3). Em ambas as câmaras laterais, são posicionadas grades (raio = 8,5 cm, altura = 17 cm) 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 habituação na sala de testes, o camundongo testado é posicionado na câmara central do aparelho. Após 5 minutos de permanência na câmara central, as portas de correr são puxadas e o camundongo tem livre acesso as câmaras laterais por um periodo de 10 minutos. 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 vazia e percentual de tempo de permanência na câmara contendo o animal não-familiar.

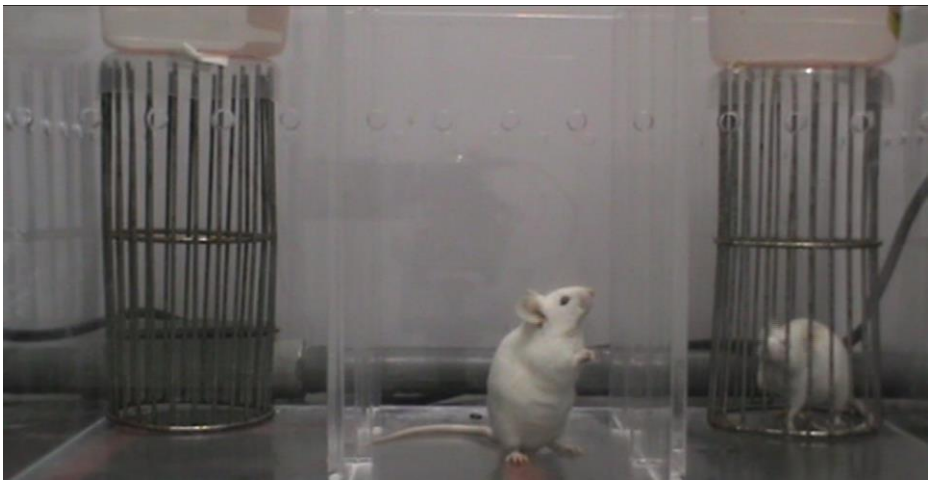

Figura 3 – Fotografia do teste de sociabilidade. Na câmara do centro está localizado o animal a ser avaliado. Posicionado dentro da grade direita está o animal não-familiar.

2.2.4. Teste do Nado Forçado (*Forced Swim Test*)

O teste do Nado Forçado (NF) é o teste mais utilizado para se avaliar comportamento tipo depressivo em roedores (Bogdanova *et al.*, 2013). Utilizamos um teste modificado do original, onde cada animal foi submetido a uma sessão de 6 minutos. O procedimento do teste é descrito em detalhes no trabalho de Filgueiras e colaboradores (2006). Neste teste, cada camundongo é colocado em um recipiente de acrílico (diâmetro = 19 cm, altura = 25 cm) preenchido com água (altura da coluna d'água = 20 cm) a uma temperatura de aproximadamente

25ºC (Figura 4). O comportamento do animal foi continuamente registrado ao longo da sessão através de uma câmera digital de vídeo.

Foi avaliado no NF o tempo de imobilidade, representado pelo tempo que os animais permaneciam flutuando com a cauda e as patas imóveis com a exceção de pequenos movimentos posturais necessários à manutenção da cabeça do animal fora da água. A medida de imobilidade foi usada como medida de comportamento associado à depressão.

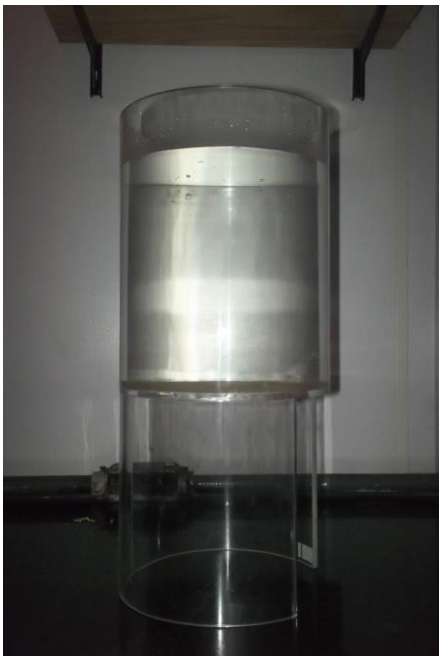

Figura 4 – Fotografia com visão lateral do recipiente preenchido com água utilizado para a realização do teste do nado forçado.

2.2.5. Teste da Preferência à Sacarose (*Sucrose Preference Test*)

Neste teste, os camundongos foram isolados e tiveram acesso durante 24 h a duas garrafas, uma contendo água e a outra contendo uma solução de sacarose a 2%. As garrafas foram medidas no dia seguinte à exposição (Figura 5). O consumo, tanto de água como de sacarose foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final (Willner, 1991b). A preferência foi calculada em valores percentuais, pela razão entre o consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e o consumo total (consumo de água (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de água) + consumo de sacarose

(peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose)) e multiplicando-o por 100 (Figura 6).

Figura 5 – Gaiola preparada para o Teste de Preferência à Sacarose

$$\text{Preferência} = \frac{\text{Consumo de Sacarose}}{\text{Consumo de Sacarose + Consumo de Água}} \times 100$$

Figura 6 – Cálculo do Teste de Preferencia à Sacarose.

2.3. **Critérios de formação dos grupos experimentais**

Os animais foram separados em 4 modelos experimentais, de acordo com a droga utilizada no protocolo de administração de livre escolha (nicotina ou etanol) e com o período em que iniciaram tal protocolo de exposição (adolescentes ou adultos, que iniciaram a autoadministração em PN122). Desta forma, foram formados 4 grupos experimentais:

Grupo exposto à nicotina na adolescencia (NIC-40): Neste grupo os animais iniciaram na adolescencia (PN42) a autoadministração por livre escolha com nicotina ou água. Tanto a pipeta com nicotina *free base* (10 µg/ml) (Sigma, St Louis, MO) quanto a pipeta com água tiveram adicionada sacarina a 2% e foram administradas como únicas fontes de líquido.

Grupo exposto à nicotina na vida adulta (NIC-120): Neste grupo os animais iniciaram na vida adulta (PN122) a autoadministração por livre escolha com nicotina ou água. Tanto a pipeta com nicotina *free base* (10 µg/ml) (Sigma, St Louis,

MO) quanto a pipeta com água tiveram adicionada sacarina a 2% e foram administradas como únicas fontes de líquido.

Grupo exposto ao etanol na adolescência (ETOH-40): Neste grupo os animais iniciaram na adolescencia (PN42) a autoadministração por livre escolha com etanol ou água. Tanto a pipeta com etanol a 10% (álcool etílico P.A. a 98,3% - VETEC) quanto a pipeta com água tiveram adicionada sacarina a 2% e foram administradas como únicas fontes de líquido.

Grupo exposto ao etanol na vida adulta (ETOH-120): Neste grupo os animais iniciaram na vida adulta (PN122) a autoadministração por livre escolha com etanol ou água. Tanto a pipeta com etanol a 10% (álcool etílico P.A. a 98,3% - VETEC) quanto a pipeta com água tiveram adicionada sacarina a 2% e foram administradas como únicas fontes de líquido.

2.4. **Teste de Livre Escolha entre Duas Garrafas (Two Bottle Choice Test)**

O protocolo de consumo voluntário ou livre-escolha entre duas garrafas é um modelo validado e amplamente utilizado para o estudo de consumo de uma solução de interesse em relação à água (Bahi e Dreyer, 2012).

Para esse experimento, foram utilizados 2 protocolos, que diferem na solução de interesse apresentada juntamente com a água. São eles o protocolo com nicotina e o protocolo com etanol.

2.4.1. Nicotina

Em PN42, o grupo dos camundongos adolescentes tiveram suas garrafas de água retiradas e os animais passaram a ter acesso a pipetas volumétricas preenchidas com uma solução contendo nicotina (10 μg/ml - Sigma, St Louis, MO) diluída em água potável (única fonte de água). Ambas pipetas continham uma solução de sacarina a 2%, a fim de mascarar o gosto amargo da nicotina. No momento da quantificação da ingesta das soluções, as pipetas foram retiradas para esvaziamento do conteúdo e preenchimento com soluções novas, sendo

então devolvidas aos animais após o período de meia hora aproximadamente. Este modelo de administração de nicotina foi utilizado pois a ingestão de nicotina ocorreu de forma *ad libitum* (modelo de agora em diante chamado de "sem restrição"), padrão semelhante ao consumo de nicotina por humanos tabagistas.

Após 5 dias de autoadministração por livre escolha por 24 h, as pipetas foram retiradas das gaiolas, privando o animal de nicotina por 48 h. Durante todo o período de privação, água e comida estiveram disponíveis *ad libitum*. Então, foram novamente ofertadas ao animal duas pipetas com as mesmas soluções previamente descritas, diferindo apenas na diminuição do período de oferta para 3 h (entre 13 h e 16 h), sendo retiradas ao final desse período e o animal mantido em privação total de líquidos por 21 h (modelo de agora em diante chamado de "com restrição"). A privação e subsequente oferta de duas opções de líquido se repete por 6 dias.

Durante os 5 primeiros dias foram utilizadas soluções de 10 µg/ml de nicotina (*free base*, Sigma, USA), após estes dias, a concentração de nicotina foi sendo progressivamente diminuída a cada 2 dias, em um procedimento é conhecido como *Fading Study*. Sendo assim, nos 8º e 9º dias a concentração foi de 10 µg/ml, nos 10º e 11º dias 7,5 µg/ml e nos 12º e 13º dias utilizamos 5 µg/ml. O objetivo do *Fading Study* é observar se os animais aumentavam o consumo da solução com nicotina a fim de manter estável a dose ingerida da droga. A aferição se fez subtraindo o volume final encontrado após 3 h pelo inicial colocado, que era sempre de 10 ml.

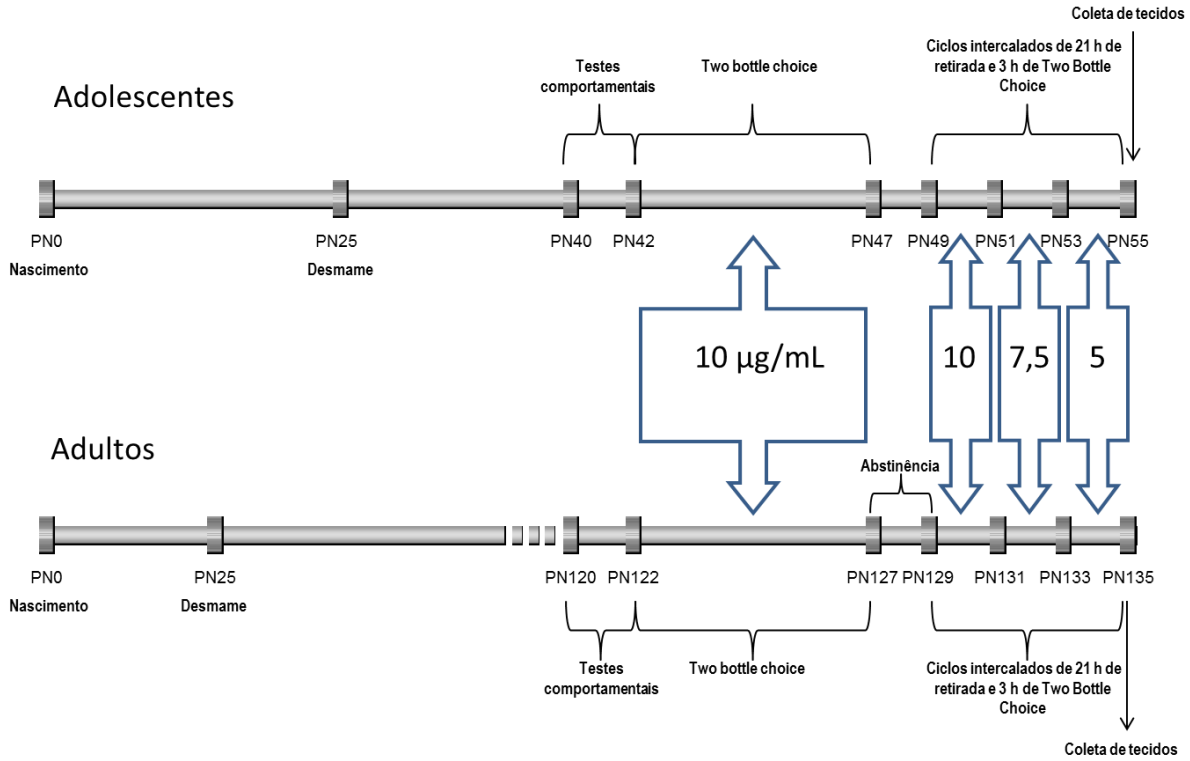

Figura 7 – Desenho experimental do Teste de Livre Escolha entre Duas Garrafas utilizando nicotina e água em animais adolescentes e adultos.

O protocolo da autoadministração de nicotina por livre escolha em animais adultos é semelhante ao protocolo com os animais adolescentes, diferindo somente do início da autoadministração, que começa em PN122 nesse grupo de animais.

2.4.2. Etanol

Após o período de ambientação no biotério, os animais adolescentes (PN42) foram separados em caixas individuais contendo maravalha limpa e receberam ração e duas garrafas, contendo em uma delas água potável, e em outra garrafa, a solução experimental de etanol. O acesso à solução experimental ocorreu em regime contínuo (24 h/todos os dias). Foi utilizado álcool etílico P.A. a 98,3% (VETEC) diluído em água nas proporções de 5 e 10% (v/v).

Após 5 dias do procedimento, os animais passaram por um período de abstinência de etanol de dois dias. Durante todo o período de privação, água e comida estaveram disponíveis *ad libitum* em todos os momentos na gaiola. No final do período de privação de dois dias e após

21h de privação de água, todos os animais foram re-expostos diariamente por 3 h (entre 13 h e 16 h) ao consumo voluntário entre água e uma solução de etanol, cuja concentração (v/v) foi reduzida gradativamente a cada 3 dias. Sendo assim, nos 8º, 9º e 10º dias a concentração foi de 10% e nos 11º, 12º e 13º dias utilizamos 5%. Após às 3 h diarias de consumo voluntário, as pipetas são retiradas e o animal é mantido em privação total de líquidos por 21 h. O objetivo do *Fading Study* é observar se os animais aumentavam o consumo da solução com etanol a fim de manter estável a dose ingerida da droga. A aferição se fez subtraindo o volume final encontrado após 3 h pelo inicial colocado, que será sempre de 10 ml.

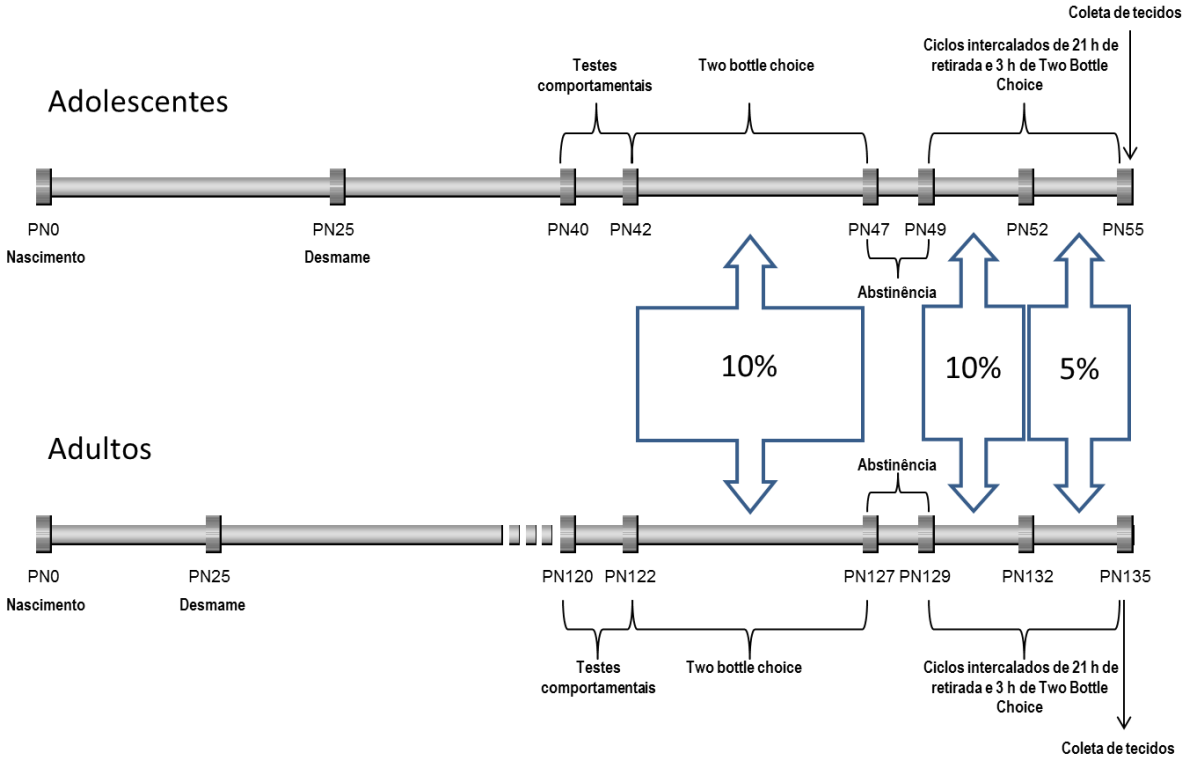

Figura 8 – Desenho experimental do Teste de Livre Escolha entre Duas Garrafas utilizando etanol e água em animais adolescentes e adultos.

O protocolo da autoadministração de etanol por livre escolha em animais adultos é semelhante ao protocolo com os animais adolescentes, diferindo somente do início da autoadministração, que começa em PN122 nesse grupo de animais.

2.5 **Análise estatística**

Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. A análise de resultados foi realizada através do software *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM, USA). Foram realizadas ANOVAs univariadas para cada teste comportamental considerando idade, cepa e sexo como fatores, seguidas de ANOVAs de menor ordem quando houver interações. Para a análise comportamental, ANOVAs foram realizadas para cada uma das idades estudadas, considerando como fatores o perfil fenotípico comportamental e sexo. ANOVAs de menor ordem foram utilizadas toda vez que interações de fenótipo com sexo foram detectadas. Diferenças entre grupos individuais foram analisadas utilizando FPLSD como teste *post-hoc*. Entretanto, toda vez que não há interação entre fenótipo e outros fatores, apenas o efeito do fenótipo é considerado.

3. RESULTADOS

3.1 Perfil de consumo

3.1.1 Consumo de nicotina em animais da cepa Suíça

Quando comparados a animais adultos, animais adolescentes apresentam maior consumo de nicotina de forma independente do modelo de teste de escolha (sem e com restrição) e doses utilizadas ($F_{(1,64)} = 20,6$; $P < 0,001$; Gráfico 9A). Este resultado pode ser claramente evidenciado com a análise do consumo ao longo dos dias. Adolescentes tiveram maior percentual de consumo de nicotina em todos os dias com a exceção do segundo, nono e décimo (Figura 11B, nono e décimo P = 0,08 e P = 0,09, respectivamente). Vale ressaltar que não foi observado efeito da dose ou do dia no percentual de consumo, indicando que não houve efeito significativo da variação do modelo do teste ou da redução da dose.

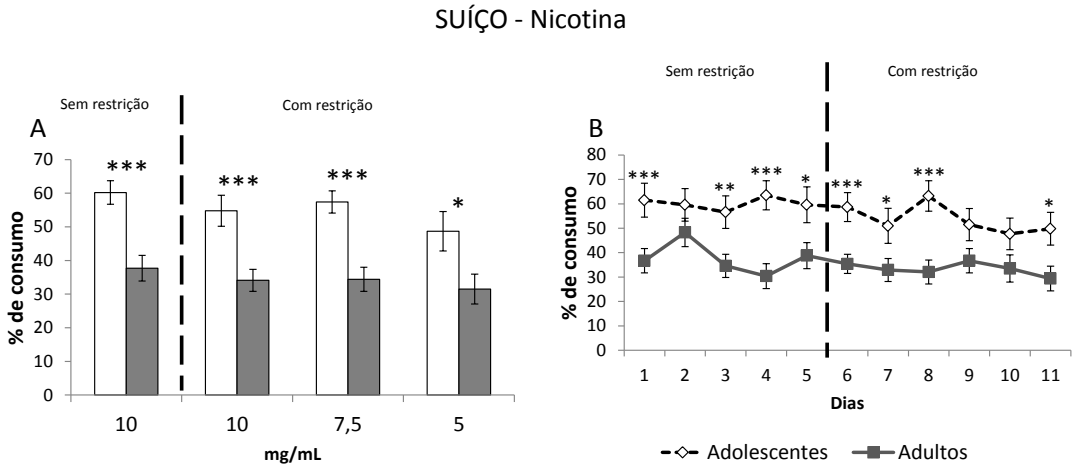

Figura 9 – Perfil de consumo de nicotina entre camundongos Suíços adolescentes e adultos com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por dose (A) ou por dia de experimento (B). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

3.1.2. Consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6

De modo geral, observamos um efeito da idade no consumo de nicotina em animais C57BL/6 ($F_{(1,56)} = 4,4$; $P < 0,05$). Porém, de forma diferente ao observado nos animais da cepa Suíça, animais adultos C57BL/6 apresentam maior consumo que adolescentes principalmente em 10 µg/ml no modelo sem restrição de líquidos (Figura 10; $F_{(1, 56)} = 3,8$; $P = 0,05$). Para esta cepa observamos um efeito do dia de teste (ANOVAr: $F_{(7,4;387,4)} = 4,1$; $P < 0,001$), gerado pela redução do percentual de consumo de nicotina ao longo dos dias em ambas as idades (Figura 10B).

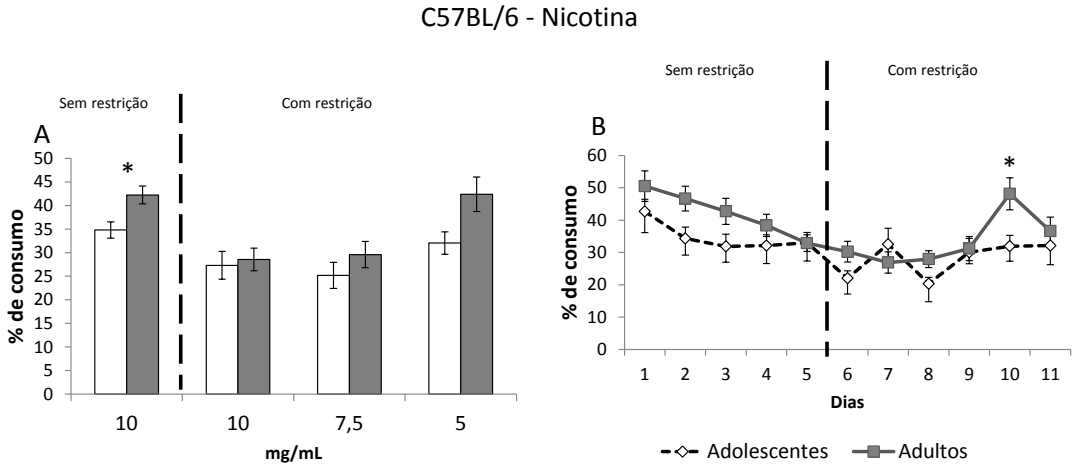

Figura 10 – Perfil de consumo de nicotina entre camundongos C57BL/6 adolescentes e adultos com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por dose (A) ou por dia de experimento (B). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

3.1.3 Comparação entre as cepas para consumo de nicotina

Para a comparação em relação ao consumo de nicotina foi observado um efeito da cepa ($F_{(1,116)} = 15,5$; $P < 0,001$) e uma interação entre cepa e idade ($F_{(1,116)} = 22,0$; $P < 0,001$). As cepas foram diferentes em relação ao dia (Dia x Cepa: $F_{(10,1150)} = 2,1$; $P < 0,05$) e ao modelo/dose (Dia x Dose: $F_{(2,7;318,2)} = 4,5$; $P < 0,01$). Podemos perceber que animais adolescentes da cepa Suiça possuem maior percentual de consumo de nicotina quando comparados com camundongos adolescentes C57BL/6 (Figura 11A e B). Não existem diferenças entre adultos na comparação entre as cepas estudadas (Figura 11C e D).

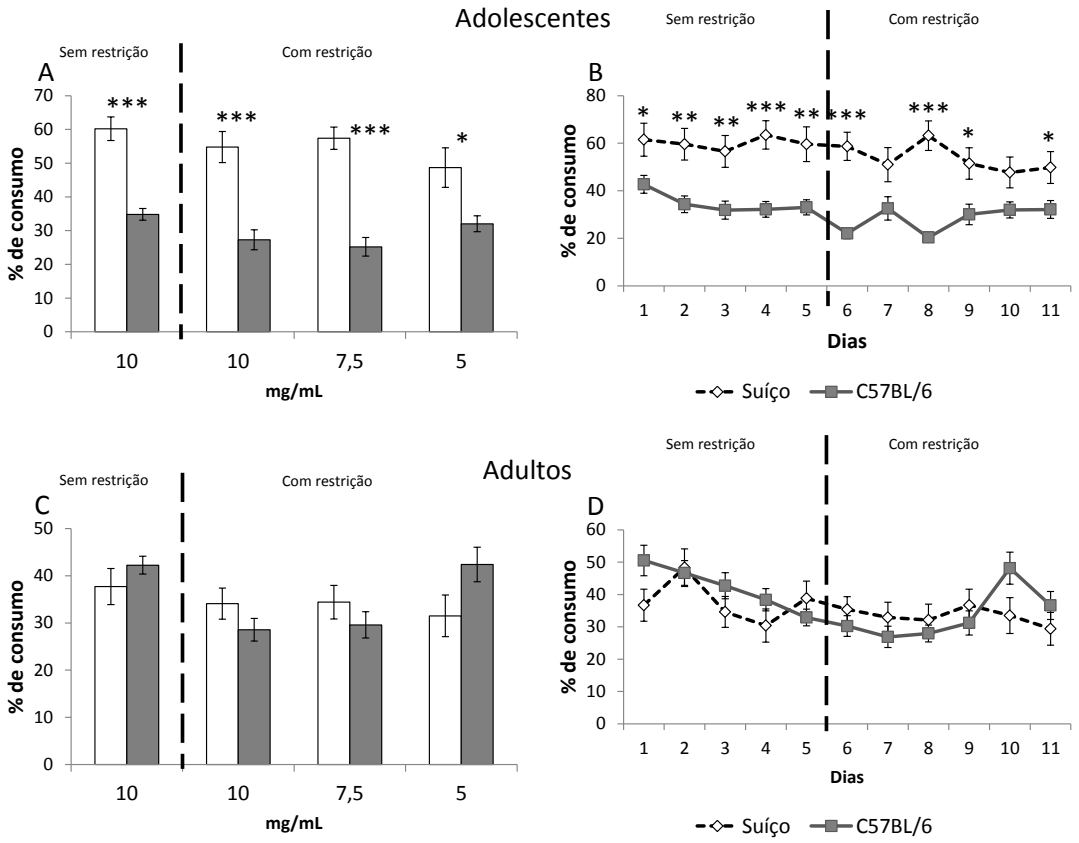

Figura 11 – Comparação entre o perfil de consumo de nicotina entre cepas durante a adolescência (A e B) e idade adulta (C e D) com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por dose (A e C) ou por dia de experimento (B e D).

3.1.4 Consumo de etanol em animais da cepa Suíça

Opostamente ao encontrado em relação ao consumo de nicotina, animais adultos possuem um maior percentual de consumo de etanol em relação aos adolescentes ($F_{(1,69)} = 4,0$; $P < 0,05$). Esta diferença se apresenta significativa quando utilizamos o modelo sem o estresse de privação de líquido utilizando a dose de 10% de etanol (Figura 12A). Da mesma forma, a redução da dose não acarretou o aumento do consumo de etanol (Figura 12B).

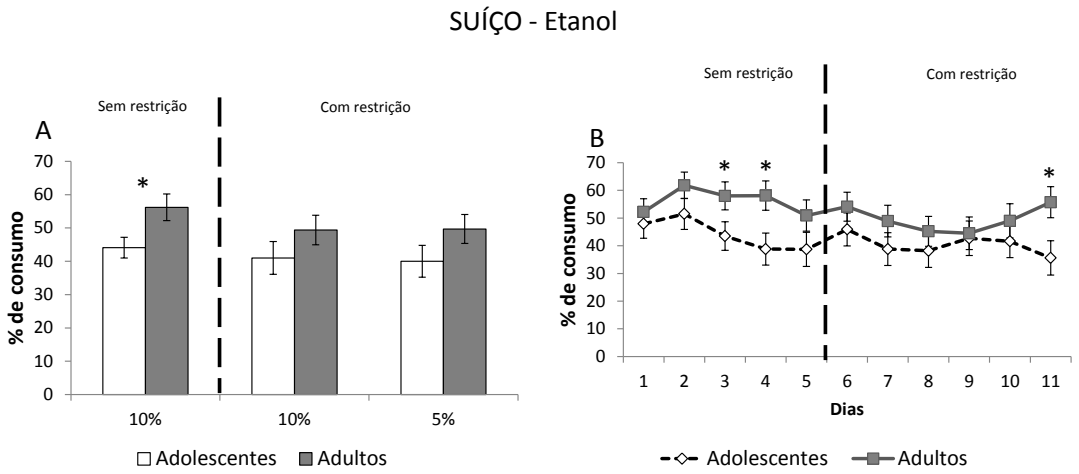

Figura 12 – Perfil de consumo de etanol entre camundongos Suíços adolescentes e adultos com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por concentração (A) ou por dia de experimento (B). A direita do tracejado vertical é indicado modelo de teste em que ocorreu a restrição da ingesta de líquido ao período de 3 horas de avaliação da livre-escolha. * P < 0,05.

3.1.5 Consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6

De forma semelhante ao observado em Suíços, animais adultos C57BL/6 apresentam maior consumo de etanol quando comparados aos adolescentes (Período: $F_{(1,70)} = 11,1$; $P = 0,01$). Essa diferença se dá de forma significativa em ambos modelos e doses estudadas (Figura 13A), da mesma forma que na maioria dos dias de avaliação (Figura 13B).

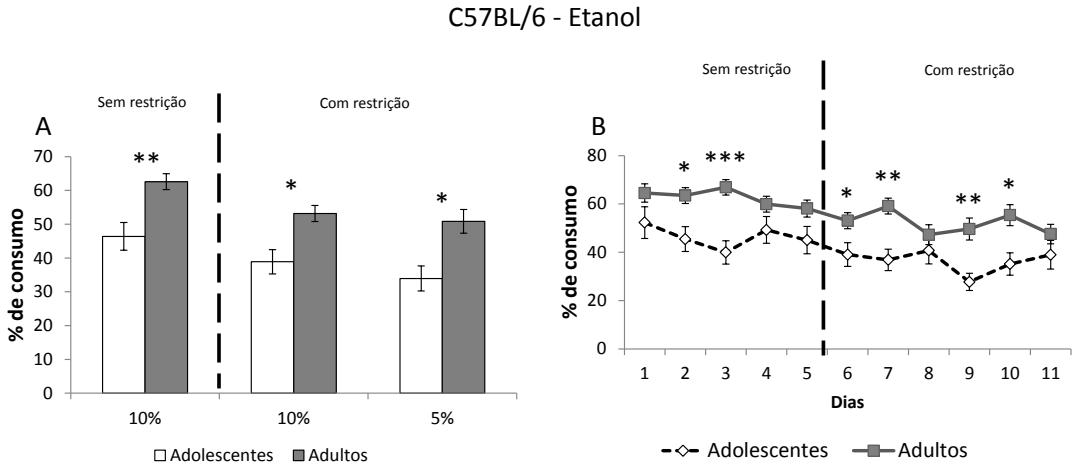

Figura 13 – Perfil de consumo de etanol entre camundongos C57BL/6 adolescentes e adultos com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por concentração (A) ou por dia de experimento (B). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

3.1.6 Comparação entre as cepas para consumo de etanol

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre as cepas tanto no consumo de animais adolescentes (Figura 14A e B) quanto entre animais adultos (Figura 14C e D).

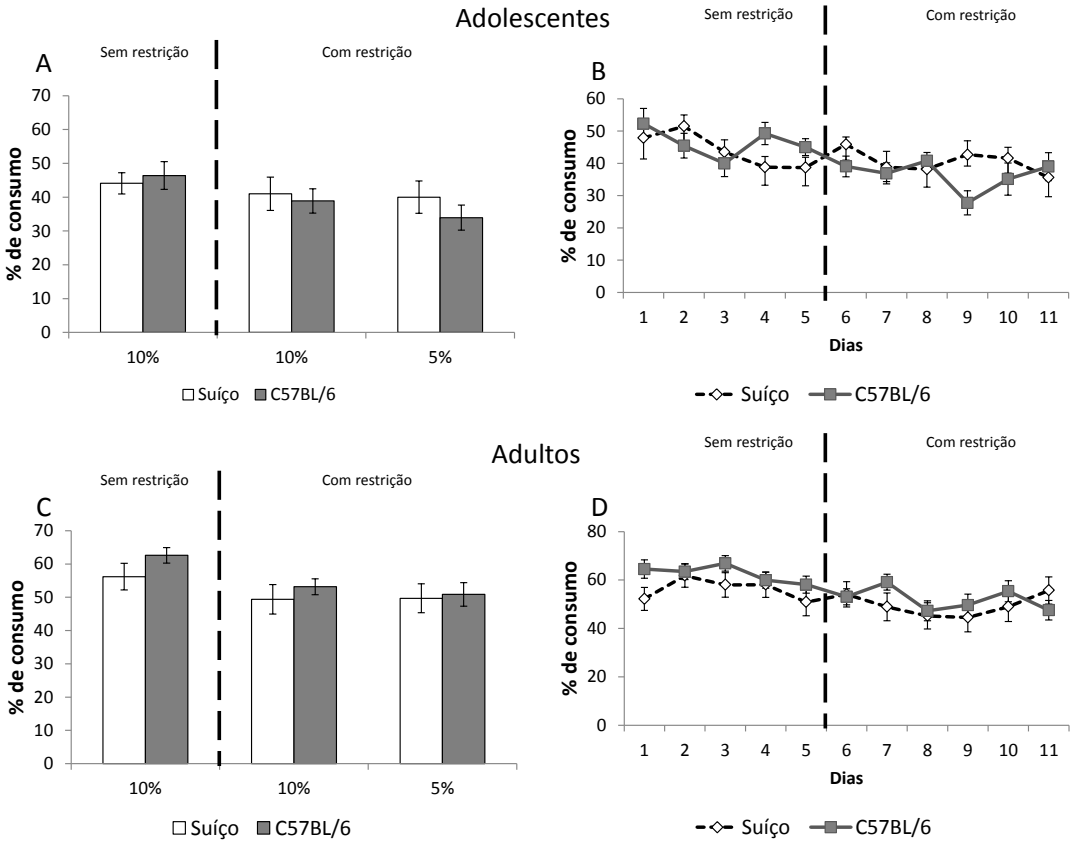

Figura 14 – Comparação entre o perfil de consumo de etanol entre cepas durante a adolescência (A e B) e idade adulta (C e D) com ou sem restrição do consumo de líquidos durante teste de livre-escolha entre duas garrafas considerando a média por concentração (A e C) ou por dia de experimento (B e D).

3.2 **Perfil comportamental**

3.2.1 Comportamento de busca pela novidade

Nossos dados mostram que animais adolescentes apresentam mais intenso comportamento de busca pela novidade (Figura 15), sendo este observado pelo aumento do número de buracos explorados no teste do campo vazado (Período: $F_{(1,266)} = 22,9$; $P < 0,001$). Além disso, observamos que animais Suíços apresentam maior comportamento de busca pela novidade que animais C57BL/6 (Cepa: $F_{(1,266)} = 12,2$; $P < 0,001$). Análises em separado demonstram que em ambas as cepas de camundongos os animais adolescentes apresentam maior comportamento de busca pela novidade quando comparados com adultos (Figura 15; C57BL/6, Período: $F_{(1,127)} = 19,3$; $P < 0,001$; Suíço, Período: $F_{(1,266)} = 8,2$; $P < 0,01$). Não observamos nenhum efeito do sexo ou interação significativa.

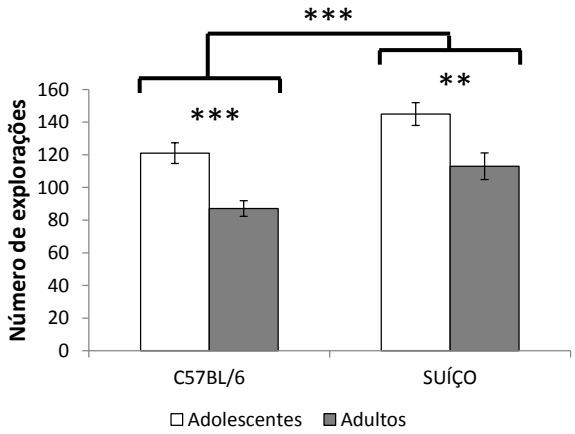

Figura 15 – Perfil de comportamento de busca por novidade no teste do campo vazado entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíço e C57BL/6. ** P < 0,01; *** P < 0,001.

3.2.2 Comportamento social

Animais adultos apresentam maior nível de sociabilidade observado pelo maior percentual de tempo de permanência no lado contendo o animal estranho no teste social das três câmaras (Figura 16, Período: $F_{(1,257)} = 16,4$; $P < 0,001$). Também observamos efeito da cepa, animais Suíços apresentam maior sociabilidade quando comparados aos C57BL/6 (Cepa: $F_{(1,257)} = 144,6$; $P < 0,001$). Análises em separado para cada cepa demonstram que o efeito da idade é mantido. Porém, evidenciamos que para a cepa C57BL/6 os efeitos são influenciados

pelo sexo (interação Idade x Sexo – $F_{(1,124)} = 4,6$; $P < 0,05$). Neste caso, apenas animais machos adultos apresentam maior sociabilidade que machos adolescentes (*Box* da Figura 16, $F_{(1,65)} = 20,1$; $P < 0,001$).

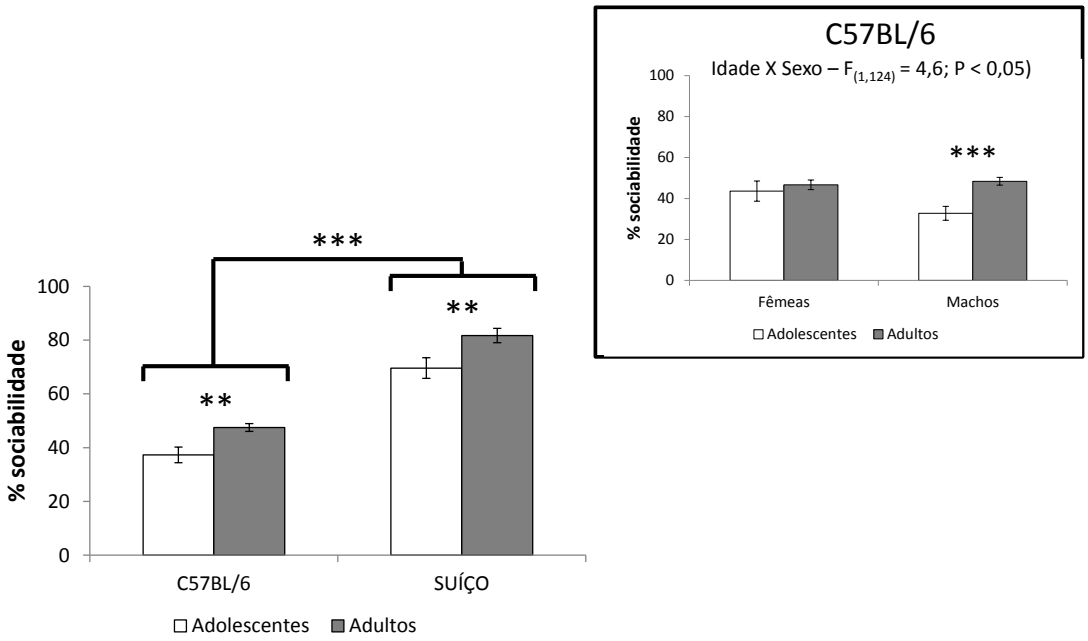

Figura 16 – Perfil de comportamento de sociabilidade no teste social das três câmaras entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíço e C57BL/6. Na caixa em destaque observamos as diferenças sexuais existentes para a cepa C57BL/6. ** P < 0,01; *** P < 0,001.

3.2.3 Comportamento associado a ansiedade e tomada de decisão

Observamos no estudo do comportamento no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) que animais Suíços possuem menor percentual de tempo (Figura 17; Cepa: $F_{(1, 255)} = 11,6$; $P < 0,001$) e de entradas (Figura 17; Cepa: $F_{(1, 255)} = 35,1$; $P < 0,001$) nos braços abertos do equipamento, sugerindo maior resposta ansiogênica. A idade também foi fator determinante da resposta comportamental associada à ansiedade (% de tempo, Idade: $F_{(1, 255)} = 36,9$; $P < 0,001$; % de entradas, Idade: $F_{(1, 255)} = 39,79$; $P < 0,001$). Em ambas as cepas animais adolescentes permanenceram mais tempo (C57BL/6, $F_{(1, 124)} = 11,5$; $P < 0,001$; Suíço, Idade: $F_{(1, 124)} = 7,8$; $P < 0,001$) e entraram mais vezes nos braços abertos (C57BL/6, $F_{(1, 131)} = 36,8$; $P < 0,01$; Suíço, Idade: $F_{(1, 131)} = 46,9$; $P < 0,001$), sugerindo menor comportamento associado a ansiedade.

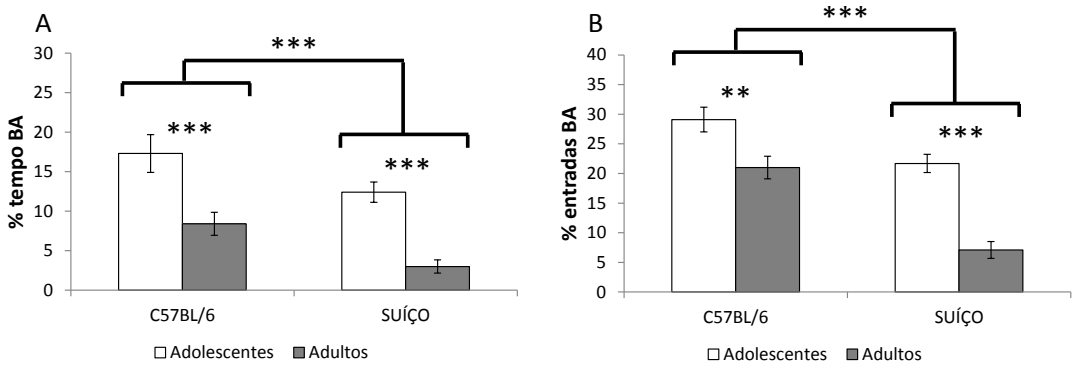

Figura 17 – Perfil de comportamento associado a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíço e C57BL/6. (A) Percentual de tempo de permanência nos braços abertos (%tempo BA); (B) Percentual de entradas dos braços abertos (%entrada BA). ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Além disso, avaliamos no teste do labirinto em cruz elevado o percentual de tempo no centro e o número de movimentos do tipo *stretching*, comportamentos que podem estar associados a avaliação de risco e tomada de decisão. Em relação ao comportamento de *stretching*, animais C57BL/6 apresentam menor número quando comparados com Suíços (Figura 18; Cepa: $F_{(1, 255)} = 52,5$; $P < 0,001$). Além disso, em nossa análise observamos interação significativa entre Cepa e Período ($F_{(1, 255)} = 11,4$; $P < 0,001$). Animais C57BL/6 não apresentam diferença entre as idades estudadas, porém, em camundongos Suíços, adolescentes apresentam maior número de *stretching* quando comparados aos adultos ($F_{(1, 124)} = 7,8$; $P < 0,01$). De modo geral, animais Suíços possuem maior tempo de permanência no centro do equipamento (Figura 18; Cepa: $F_{(1, 255)} = 4,2$; $P < 0,05$). Porém este efeito é determinado pelo maior tempo no centro presente entre animais adolescentes (interação Cepa x Período: $F_{(1, 255)} = 35,1$; $P < 0,01$; efeito da idade nos Suíço: $F_{(1, 124)} = 11,5$; $P < 0,001$).

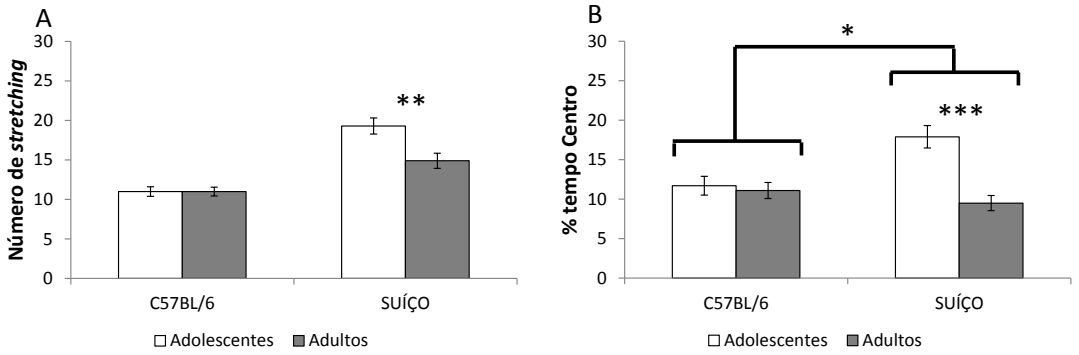

Figura 18 – Número de *stretching* realizados para o braço aberto (A) e percentual de tempo de permanência no centro do aparelho (B) no teste do labirinto em cruz elevado entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíço e C57BL/6. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

3.2.4 Comportamento associado a resposta a recompensas naturais

Apesar de não termos encontrado efeitos significativos da cepa ou da idade (Figura 19), encontramos em animais Suíços uma interação entre os fatores idade e sexo ($F_{(1,131)} = 7,8$; $P < 0,05$). Neste caso, animais adultos fêmeas possuem maior percentual de consumo de sacarose quando comparados aos adolescentes (*Box* da Figura 21; $F_{(1,64)} = 4,5$; $P < 0,05$).

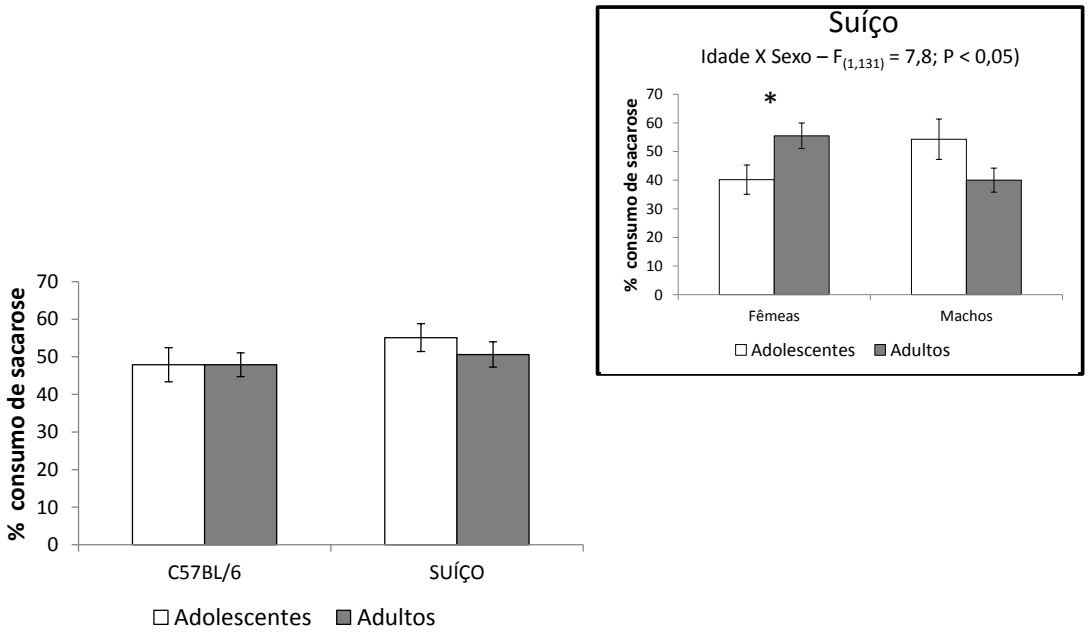

Figura 19 – Perfil de comportamento de busca por recompensa natural no teste de preferência pela sacarose entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíço e C57BL/6. Na caixa em destaque observamos as diferenças sexuais existentes para a cepa Suíça. * para comparações entre adolescentes e adultos. * P < 0,05.

3.2.5 Comportamento no teste do nado forçado

Em relação ao teste do nado forçado, nossos dados indicam efeito de cepa para todas as variáveis estudadas (Tempo de escalada: $F_{(1,260)} = 8,8$; $P < 0,01$; Tempo de nado: $F_{(1,260)} = 18,5$; $P < 0,001$; Tempo de imobilidade: $F_{(1,260)} = 23,0$; $P < 0,001$). Animais Suíços apresentaram menor tempo de escalada, maiores tempos de nado e não apresentaram comportamento de imobilidade (Figura 20A, B e C). Além disso, observamos uma interação entre Cepa e Idade para tempo de escalada ($F_{(1,260)} = 3,9$; $P < 0,05$) e tempo de nado ($F_{(1,260)} = 4,7$; $P < 0,05$). A

idade só foi relevante em animais da cepa Suíça (Idade: $F_{(1,135)} = 4,9$; $P < 0,05$). Neste caso, animais adolescentes apresentam maior tempo realizando o comportamento de escalada e menor tempo de nado quando comparado a animais adultos (Figura 20A e B).

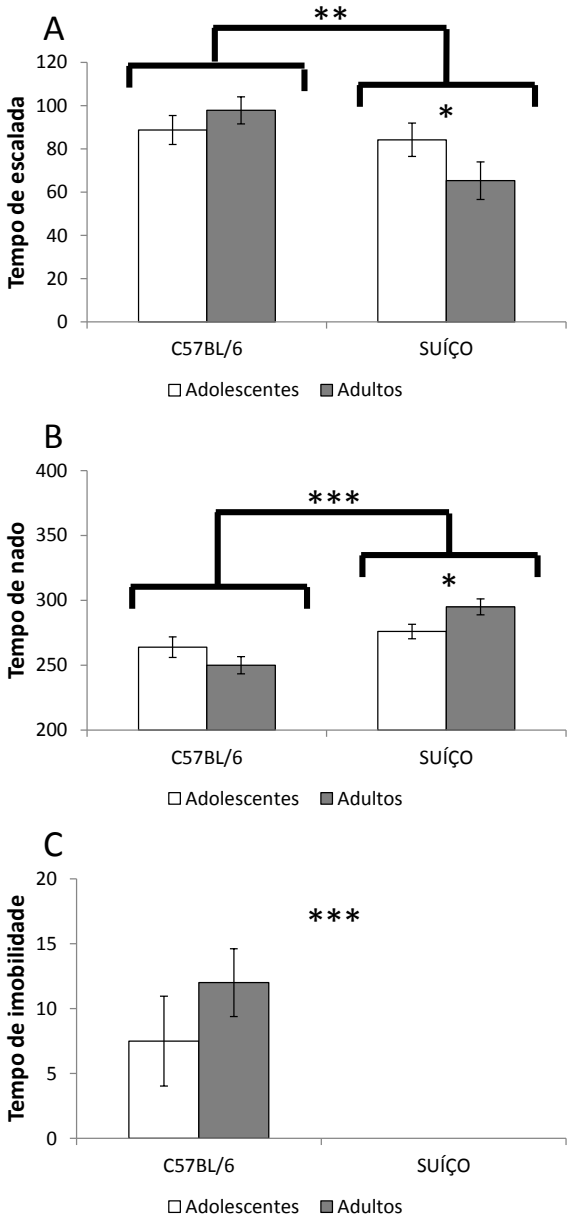

Figura 20 – Perfil de comportamento no teste do nado forçado entre camundongos adolescentes e adultos das cepas Suíço e C57BL/6. (A) Tempo total de comportamento de escalada; (B) Tempo total de tempo de nado; e (C) Tempo total de imobilidade. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

3.3. **Relação entre as variáveis comportamentais**

A fim de entender as possíveis associações entre as variáveis comportamentais, utilizamos o coeficiente de correlação de Pearson. Neste caso consideramos relevante, mesmo quando significativa, somente quando uma correlação se apresenta com valor acima de 0,7 (Mukaka, 2012).

De forma interessante, somente observamos fortes correlações entre variáveis de mesmo conteúdo categórico (%tempo nos braços abertos vs. %entradas nos braços abertos do LCE) ou, como obviamente esperado, entre variáveis complementares (tempo de escalada e tempo de nado no NF). Devido a este fato realizamos a análise do efeito dos níveis de ansiedade sobre o consumo das drogas utilizando apenas o percentual de tempo no braço aberto. Da mesma forma, utilizamos o tempo de escalada como parâmetro da análise quando considerado o fenótipo comportamental no teste do nado forçado. A matriz de correlação geral é apresentada na tabela 1 e, em particular, para cepa C57BL/6 na tabela 2 e cepa Suíça na tabela 3.

Correlations

		%sucrose	HB	%TBA	%TC	stret	%EntBA	ST	Tempo Esc	Tempo Nado	Tempo Imob
%sucrose	Pearson Correlation	1	.047	-.069	-.043	-.026	-.124*	.021	.123*	-.100	-.049
	Sig. (2-tailed)		.445	.274	.495	.679	.048	.736	.048	.108	.431
	N	271	265	254	254	254	254	256	259	259	259
HB	Pearson Correlation	.047	1	.256**	.141*	.359**	.250**	.122	.050	-.025	-.073
	Sig. (2-tailed)	.445		.000	.025	.000	.000	.052	.420	.691	.242
	N	265	266	253	253	253	253	255	258	258	258
%TBA	Pearson Correlation	-.069	.256**	1	.321**	.108	.763**	-.199**	.095	-.099	.032
	Sig. (2-tailed)	.274	.000		.000	.085	.000	.002	.136	.121	.614
	N	254	253	255	255	255	255	246	248	248	248
%TC	Pearson Correlation	-.043	.141*	.321**	1	.463**	.257**	-.028	.021	-.008	-.038
	Sig. (2-tailed)	.495	.025	.000		.000	.000	.657	.737	.899	.551
	N	254	253	255	255	255	255	246	248	248	248
stret	Pearson Correlation	-.026	.359**	.108	.463**	1	.044	.330**	-.027	.060	-.111
	Sig. (2-tailed)	.679	.000	.085	.000		.483	.000	.670	.347	.082
	N	254	253	255	255	255	255	246	248	248	248
%EntBA	Pearson Correlation	-.124*	.250**	.763**	.257**	.044	1	-.241**	.084	-.096	.056
	Sig. (2-tailed)	.048	.000	.000	.000	.483		.000	.186	.130	.376
	N	254	253	255	255	255	255	246	248	248	248
ST	Pearson Correlation	.021	.122	-.199**	-.028	.330**	-.241**	1	-.089	.142*	-.192**
	Sig. (2-tailed)	.736	.052	.002	.657	.000	.000		.160	.025	.002
	N	256	255	246	246	246	246	257	251	251	251
Tempo Esc	Pearson Correlation	.123*	.050	.095	.021	-.027	.084	-.089	1	-.953**	.061
	Sig. (2-tailed)	.048	.420	.136	.737	.670	.186	.160		.000	.325
	N	259	258	248	248	248	248	251	260	260	260
Tempo Nado	Pearson Correlation	-.100	-.025	-.099	-.008	.060	-.096	.142*	-.953**	1	-.361**
	Sig. (2-tailed)	.108	.691	.121	.899	.347	.130	.025	.000		.000
	N	259	258	248	248	248	248	251	260	260	260
Tempo Imob	Pearson Correlation	-.049	-.073	.032	-.038	-.111	.056	-.192**	.061	-.361**	1
	Sig. (2-tailed)	.431	.242	.614	.551	.082	.376	.002	.325	.000	
	N	259	258	248	248	248	248	251	260	260	260

Tabela 1: Matriz de correlação geral dos comportamentos estudados considerando ambas as cepas. *P < 0,05; **P < 0,01.

%sucrose: percentual de consumo de sucrose;
HB: Número de buracos explorados no teste do Campo Vazado ("Hole Board Test");
%TBA: Percentual de tempo no braço aberto no Teste do Labirinto em Cruz Elevado;
%TC: Percentual de tempo no centro no Teste do Labirinto em Cruz Elevado;
Stret: Número de *stretching* realizados para os braços abertos do Teste do Labirinto em Cruz Elevado;
ST: Percentual de tempo no lado social no Teste de sociabilidade das 3 câmaras;
Tempo Esc: Tempo de escalada no Teste do nado forçado;
Tempo Nado: Tempo de nado no Teste do nado forçado;
Temp Imob: Tempo de imobilidade no Teste de nado forçado.

Correlations[a]

		%suc	HB	%TBA	%TC	stret	%EntBA	ST	Temp Esc	Tempo nado	Tempo Imob
%suc	Pearson Correlation	1	-.048	-.110	-.020	-.074	-.194*	.122	.157	-.126	-.043
	Sig. (2-tailed)		.596	.226	.825	.418	.031	.179	.081	.162	.633
	N	131	126	123	123	123	123	123	124	124	124
HB	Pearson Correlation	-.048	1	.269**	.098	.284**	.319**	-.052	-.050	.049	-.006
	Sig. (2-tailed)	.596		.003	.279	.001	.000	.566	.578	.591	.946
	N	126	127	123	123	123	123	123	124	124	124
%TBA	Pearson Correlation	-.110	.269**	1	.291**	.135	.730**	-.122	-.015	.025	-.027
	Sig. (2-tailed)	.226	.003		.001	.134	.000	.182	.867	.784	.768
	N	123	123	124	124	124	124	121	122	122	122
%TC	Pearson Correlation	-.020	.098	.291**	1	.477**	.305**	-.102	-.015	.020	-.014
	Sig. (2-tailed)	.825	.279	.001		.000	.001	.267	.868	.829	.877
	N	123	123	124	124	124	124	121	122	122	122
stret	Pearson Correlation	-.074	.284**	.135	.477**	1	.153	.064	-.018	.006	.026
	Sig. (2-tailed)	.418	.001	.134	.000		.090	.486	.844	.948	.778
	N	123	123	124	124	124	124	121	122	122	122
%EntBA	Pearson Correlation	-.194*	.319**	.730**	.305**	.153	1	-.074	-.091	.107	-.056
	Sig. (2-tailed)	.031	.000	.000	.001	.090		.417	.317	.243	.542
	N	123	123	124	124	124	124	121	122	122	122
ST	Pearson Correlation	.122	-.052	-.122	-.102	.064	-.074	1	.086	-.072	-.018
	Sig. (2-tailed)	.179	.566	.182	.267	.486	.417		.344	.431	.843
	N	123	123	121	121	121	121	124	122	122	122
Tempo Esc	Pearson Correlation	.157	-.050	-.015	-.015	-.018	-.091	.086	1	-.915**	-.002
	Sig. (2-tailed)	.081	.578	.867	.868	.844	.317	.344		.000	.982
	N	124	124	122	122	122	122	122	125	125	125
Tempo nado	Pearson Correlation	-.126	.049	.025	.020	.006	.107	-.072	-.915**	1	-.401**
	Sig. (2-tailed)	.162	.591	.784	.829	.948	.243	.431	.000		.000
	N	124	124	122	122	122	122	122	125	125	125
Tempo Imob	Pearson Correlation	-.043	-.006	-.027	-.014	.026	-.056	-.018	-.002	-.401**	1
	Sig. (2-tailed)	.633	.946	.768	.877	.778	.542	.843	.982	.000	
	N	124	124	122	122	122	122	122	125	125	125

Tabela 2: Matriz de correlação geral dos comportamentos estudados considerando cepa C57BL/6. *P < 0,05; **P < 0,01.
%sucrose: percentual de consumo de sucrose;
HB: Número de buracos explorados no teste do Campo Vazado ("Hole Board Test");
%TBA: Percentual de tempo no braço aberto no Teste do Labirinto em Cruz Elevado;
%TC: Percentual de tempo no centro no Teste do Labirinto em Cruz Elevado;
Stret: Número de *stretching* realizados para os braços abertos do Teste do Labirinto em Cruz Elevado;
ST: Percentual de tempo no lado social no Teste de sociabilidade das 3 câmaras;
Tempo Esc: Tempo de escalada no Teste do nado forçado;
Tempo Nado: Tempo de nado no Teste do nado forçado;
Temp Imob: Tempo de imobilidade no Teste de nado forçado.

Correlations[a]

		%suc	HB	%TBA	%TC	stret	%EntBA	ST	Tempo Esc	Temp nado	Tempo Imob
%suc	Pearson Correlation	1	.080	.021	-.079	-.067	.001	-.113	.123	-.123	.[b]
	Sig. (2-tailed)		.348	.811	.370	.448	.992	.194	.156	.156	.
	N	140	139	131	131	131	131	133	135	135	135
HB	Pearson Correlation	.080	1	.383**	.130	.305**	.390**	-.012	.210*	-.210*	.[b]
	Sig. (2-tailed)	.348		.000	.141	.000	.000	.887	.015	.015	.
	N	139	139	130	130	130	130	132	134	134	134
%TBA	Pearson Correlation	.021	.383**	1	.448**	.285**	.824**	-.136	.194*	-.194*	.[b]
	Sig. (2-tailed)	.811	.000		.000	.001	.000	.130	.030	.030	.
	N	131	130	131	131	131	131	125	126	126	126
%TC	Pearson Correlation	-.079	.130	.448**	1	.460**	.324**	-.098	.092	-.092	.[b]
	Sig. (2-tailed)	.370	.141	.000		.000	.000	.277	.308	.308	.
	N	131	130	131	131	131	131	125	126	126	126
stret	Pearson Correlation	-.067	.305**	.285**	.460**	1	.246**	.154	.113	-.113	.[b]
	Sig. (2-tailed)	.448	.000	.001	.000		.005	.087	.208	.208	.
	N	131	130	131	131	131	131	125	126	126	126
%EntBA	Pearson Correlation	.001	.390**	.824**	.324**	.246**	1	-.085	.170	-.170	.[b]
	Sig. (2-tailed)	.992	.000	.000	.000	.005		.347	.057	.057	.
	N	131	130	131	131	131	131	125	126	126	126
ST	Pearson Correlation	-.113	-.012	-.136	-.098	.154	-.085	1	.004	-.004	.[b]
	Sig. (2-tailed)	.194	.887	.130	.277	.087	.347		.965	.965	.
	N	133	132	125	125	125	125	133	129	129	129
Tempo Esc	Pearson Correlation	.123	.210*	.194*	.092	.113	.170	.004	1	-1.000**	.[b]
	Sig. (2-tailed)	.156	.015	.030	.308	.208	.057	.965		.000	.
	N	135	134	126	126	126	126	129	135	135	135
Tempo nado	Pearson Correlation	-.123	-.210*	-.194*	-.092	-.113	-.170	-.004	-1.000**	1	.[b]
	Sig. (2-tailed)	.156	.015	.030	.308	.208	.057	.965	.000		.
	N	135	134	126	126	126	126	129	135	135	135
Tempo Imob	Pearson Correlation	.[b]	.[b]	.[b]	.[b]	.[b]	.[b]	.[b]	.[b]	.[b]	.[b]
	Sig. (2-tailed)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	N	135	134	126	126	126	126	129	135	135	135

Tabela 3: Matriz de correlação geral dos comportamentos estudados considerando cepa Suíça. *P < 0,05; **P < 0,01.

%sucrose: percentual de consumo de sucrose;
HB: Número de buracos explorados no teste do Campo Vazado ("Hole Board Test");
%TBA: Percentual de tempo no braço aberto no Teste do Labirinto em Cruz Elevado;
%TC: Percentual de tempo no centro no Teste do Labirinto em Cruz Elevado;
Stret: Número de *stretching* realizados para os braços abertos do Teste do Labirinto em Cruz Elevado;
ST: Percentual de tempo no lado social no Teste de sociabilidade das 3 câmaras;
Tempo Esc: Tempo de escalada no Teste do nado forçado;
Tempo Nado: Tempo de nado no Teste do nado forçado;
Temp Imob: Tempo de imobilidade no Teste de nado forçado.

3.3.1. Formação dos grupos experimentais para análise da susceptibilidade ao consumo de drogas

Como descrito na seção de material e métodos, foi utilizado o valor da mediana considerada para cada cepa e idade como ponto de corte entre animais considerados com baixa e alta expressão do fenótipo, sendo excluídos os animais com mesmo valor da mediana. A única exceção a esse critério aconteceu na formação dos grupos relacionados ao comportamento associado à ansiedade. Devido ao fato de adultos possuírem muitos animais que não entraram nos braços abertos (zero percentual de entrada nos braços abertos), a mediana foi igual à zero. Neste caso todos os animais com escore zero foram considerados altamente ansiosos e os demais com baixa ansiedade.

3.4. **Estudo dos fenótipos comportamentais na susceptibilidade ao consumo das drogas**

3.4.1. Efeito da sociabilidade

Os efeitos da sociabilidade foram dependentes da cepa estudada, de forma que somente em animais *outbred* Suíços os níveis de sociabilidade afetaram o consumo de drogas. Em nenhum caso observamos efeitos dependentes do sexo dos animais.

Adolescentes Suíços que apresentam baixa sociabilidade apresentam no geral maior consumo de nicotina ($F_{(1,29)} = 4,1$, $P < 0,05$). Este efeito pode ser observado pelas diferenças encontradas na dose de 10 µg/kg sem ($F_{(1,29)} = 5,9$, $P < 0,05$) e com restrição de líquido ($F_{(1,29)} = 5,9$, $P < 0,05$), como também, na dose de 7,5 µg/kg ($F_{(1,29)} = 6,2$, $P < 0,05$; Figura 21A e B). Em adultos não observamos qualquer efeito para essa variável (Figura 21C e D).

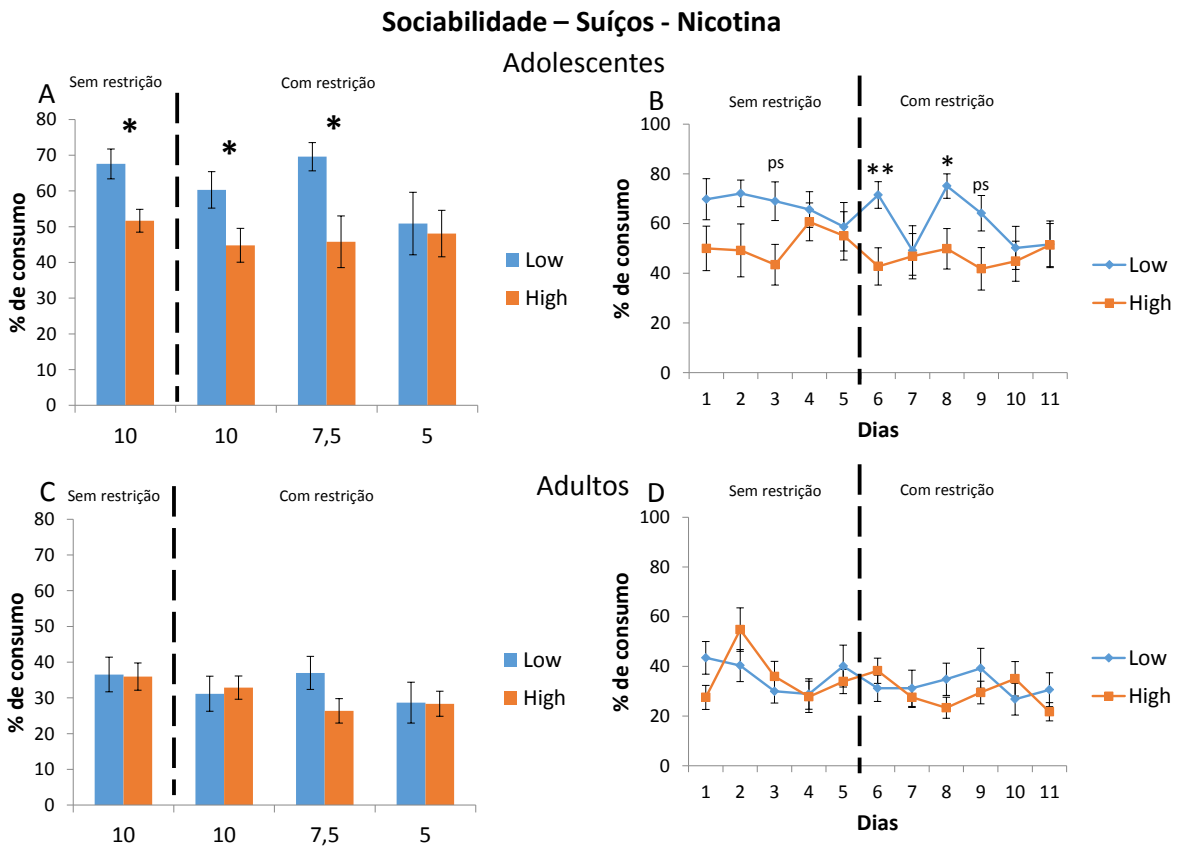

Figura 21 – Efeito da sociabilidade no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). * P < 0,05; ** P < 0,01; PS, próximo da significância onde P < 0,09.

Em relação aos animais *inbred* C57BL/6, não observamos nenhum efeito da sociabilidade no consumo de nicotina tanto em adolescentes (Figura 22A e B) quanto em adultos (Figuras 22C e D).

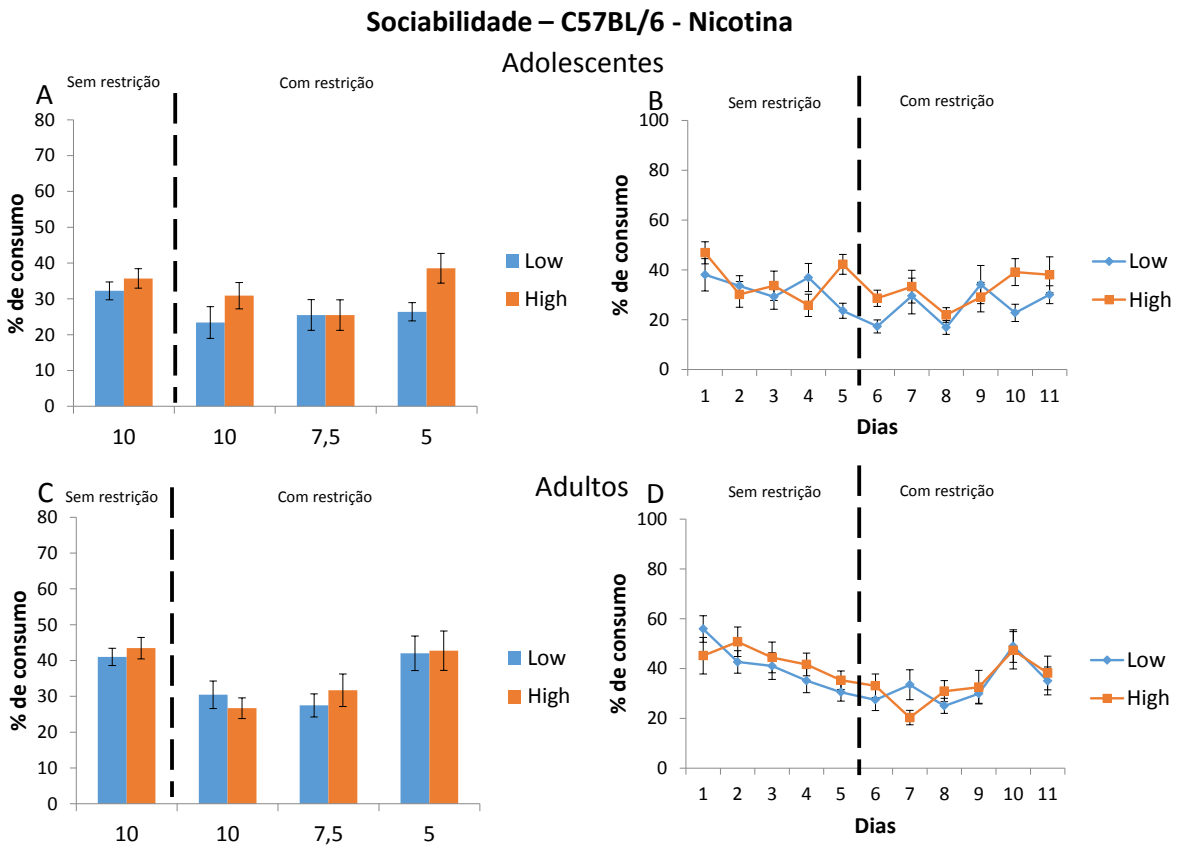

Figura 22 – Efeito da sociabilidade no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

Em relação ao consumo de etanol, os níveis de sociabilidade não afetaram o consumo em animais adolescentes Suíços (Figura 23A e B). Em adultos observamos uma tendência a um maior consumo de etanol na condição sem estresse de privação de líquido em animais com altos níveis de sociabilidade ($F_{(1,38)} = 3,5$, $P = 0,07$; Figura 23C e D).

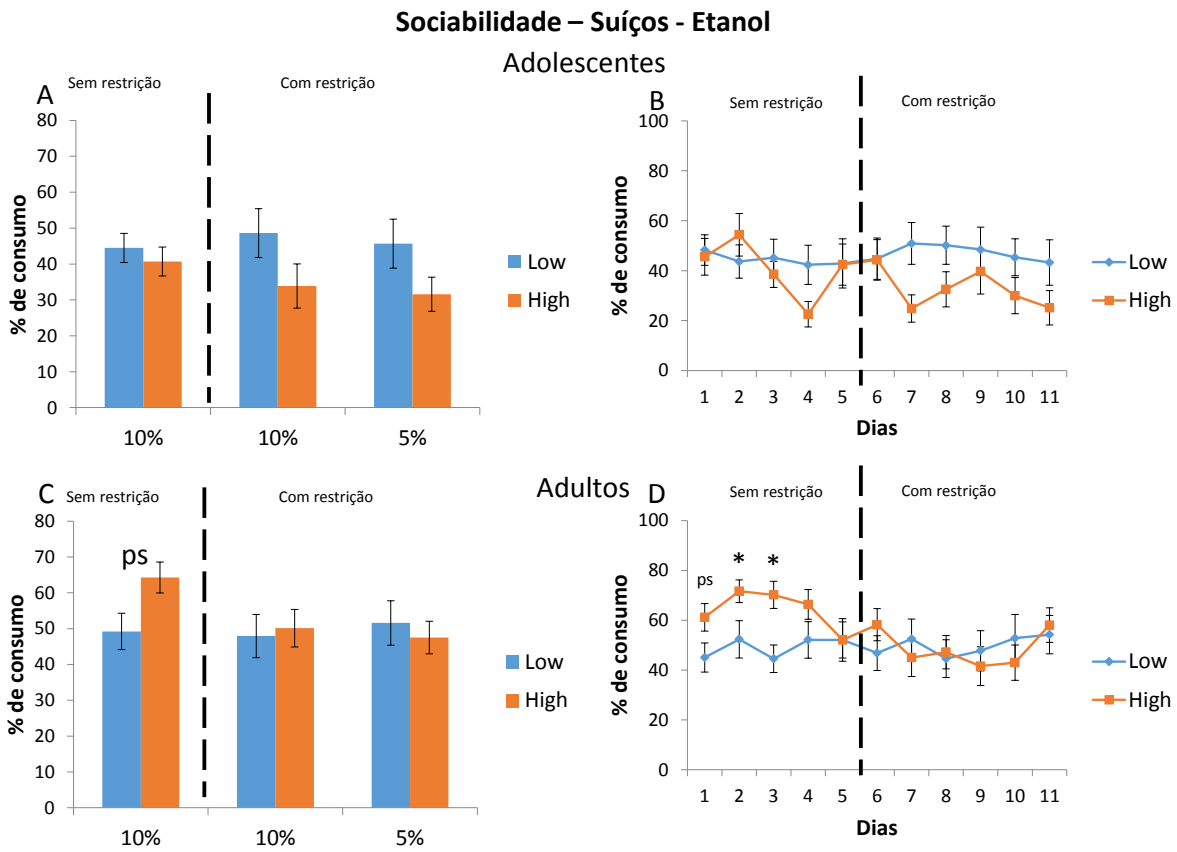

Figura 23 – Efeito da sociabilidade no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). PS = próximo da significância, P = 0,07; * P < 0,05.

Da mesma forma ao observado para a nicotina, os níveis de sociabilidade não afetaram o consumo de etanol em animais *inbred* C57BL/6 tanto em adolescentes (Figura 24A e B) quanto em adultos (Figuras 24C e D).

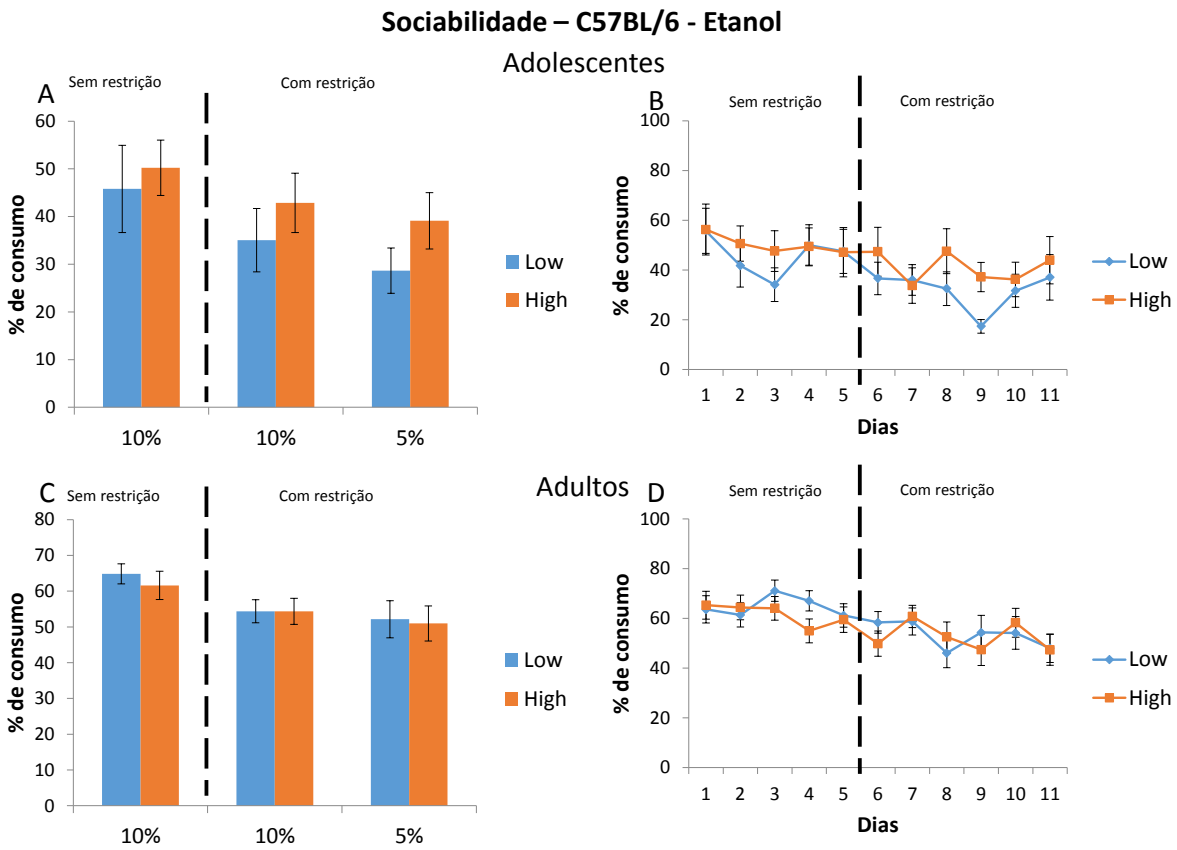

Figura 24 – Efeito da sociabilidade no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

3.4.2. Efeito da resposta a recompensa natural (consumo de sacarose)

Os efeitos da resposta a recompensa natural foram dependentes da cepa e da droga estudada, sendo os efeitos mais robustos apresentados para o consumo de etanol. Em nenhum caso observamos interações entre grupo e sexo dos animais.

Em relação ao consumo de nicotina, não observamos diferenças entre os grupos com alto ou baixo consumo de sacarose em animais adolescentes (Figura 25A e B) ou adultos (Figura 25C e D).

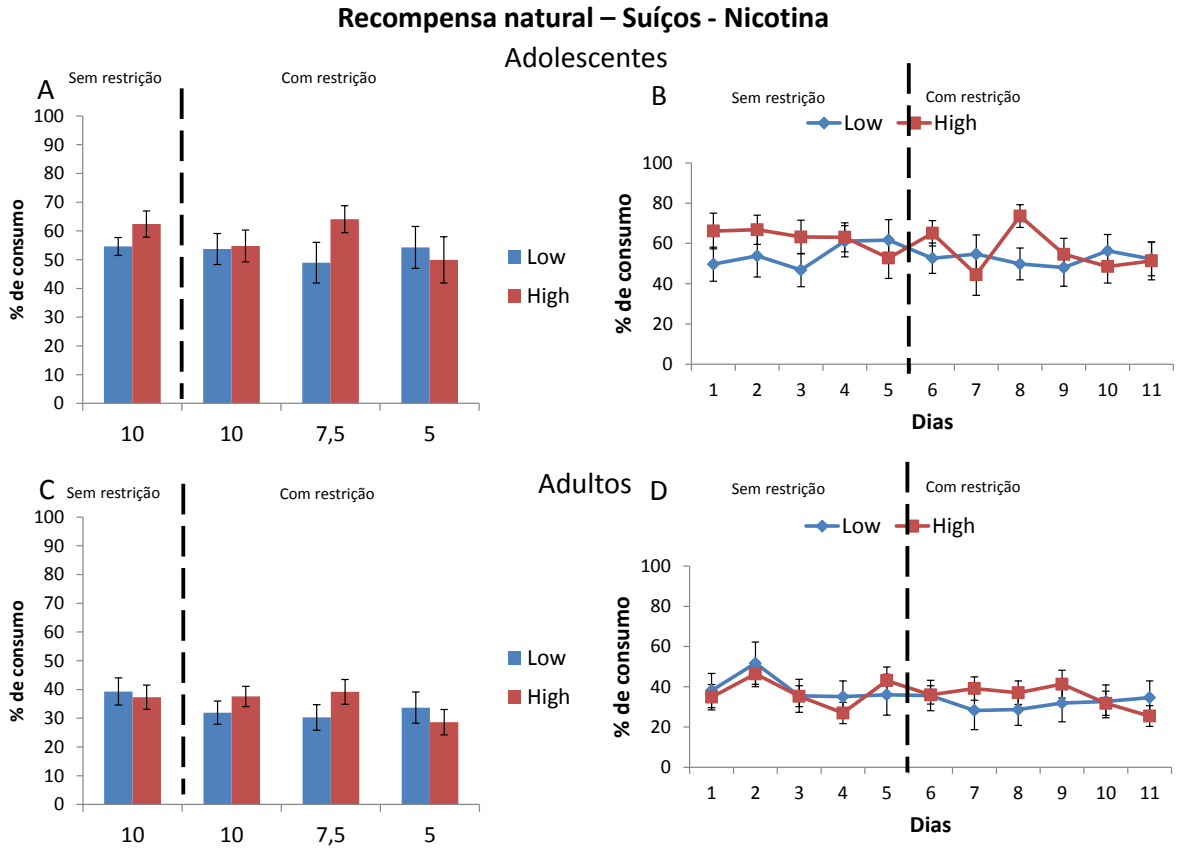

Figura 25 – Efeito da resposta à recompensa natural no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

Em animais da cepa C57BL/6, o consumo de nicotina foi maior em animais adolescentes com baixo perfil de consumo de sacarose quando não há estresse por restrição de líquidos ($F_{(1,22)} = 5,3$, $P < 0,05$; Figura 28A). A análise *pos hoc* por dia indicou que apenas no 4º dia esta diferença se mostrou significativa (Figura 26B). Em animais adultos, não observamos efeitos significativos (Figura 26C e D).

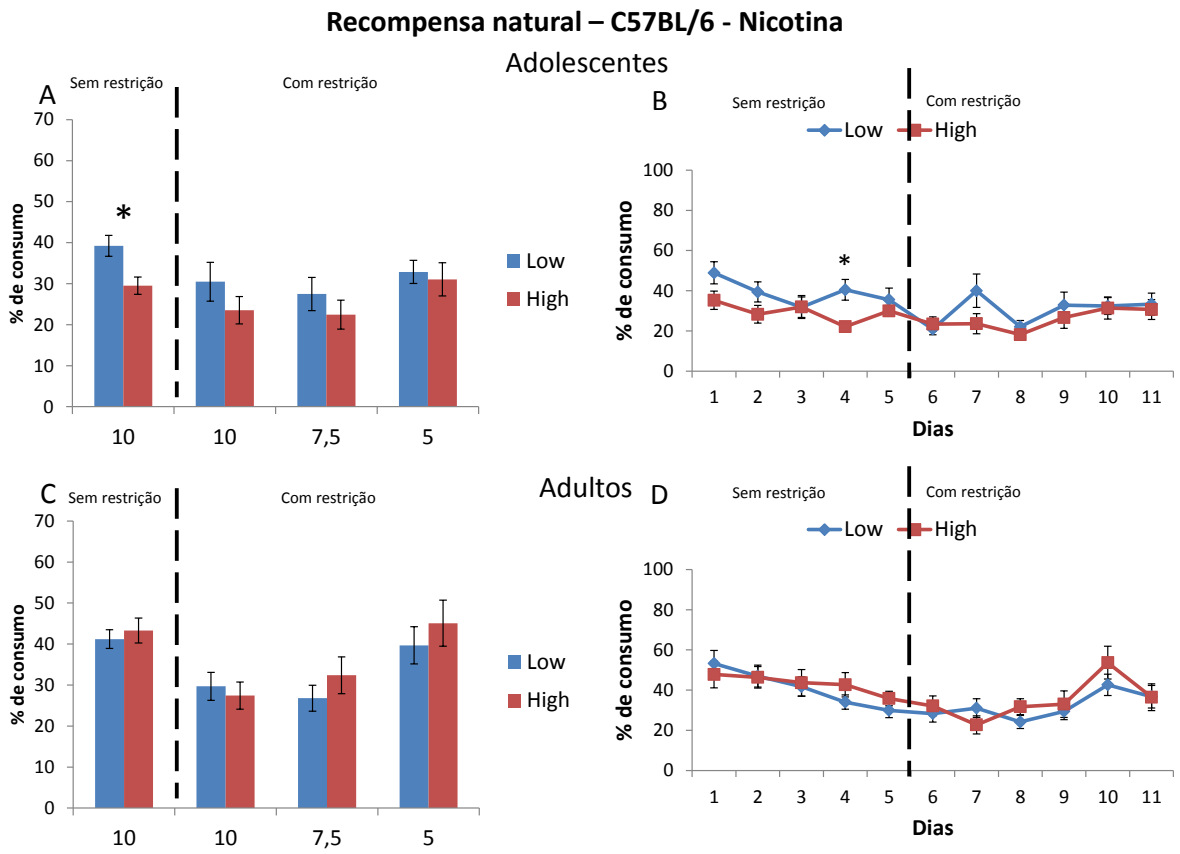

Figura 26 – Efeito da resposta à recompensa natural no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). * P < 0,05.

Animais Suíços adolescentes com o perfil de grande procura por recompensa natural apresentam maior consumo de etanol em todas as condições e doses estudadas (10% sem restrição, $F_{(1,30)} = 6,6$, $P < 0,05$; 10% com restrição, $F_{(1,30)} = 6,2$, $P < 0,05$; 5% com restrição, 10% sem restrição, $F_{(1,30)} = 7,7$, $P < 0,05$; Figura 27A e B). Em animais adultos não há efeito do perfil de procura por recompensas naturais no consumo de etanol em ambas as cepas (Figura 27C e D).

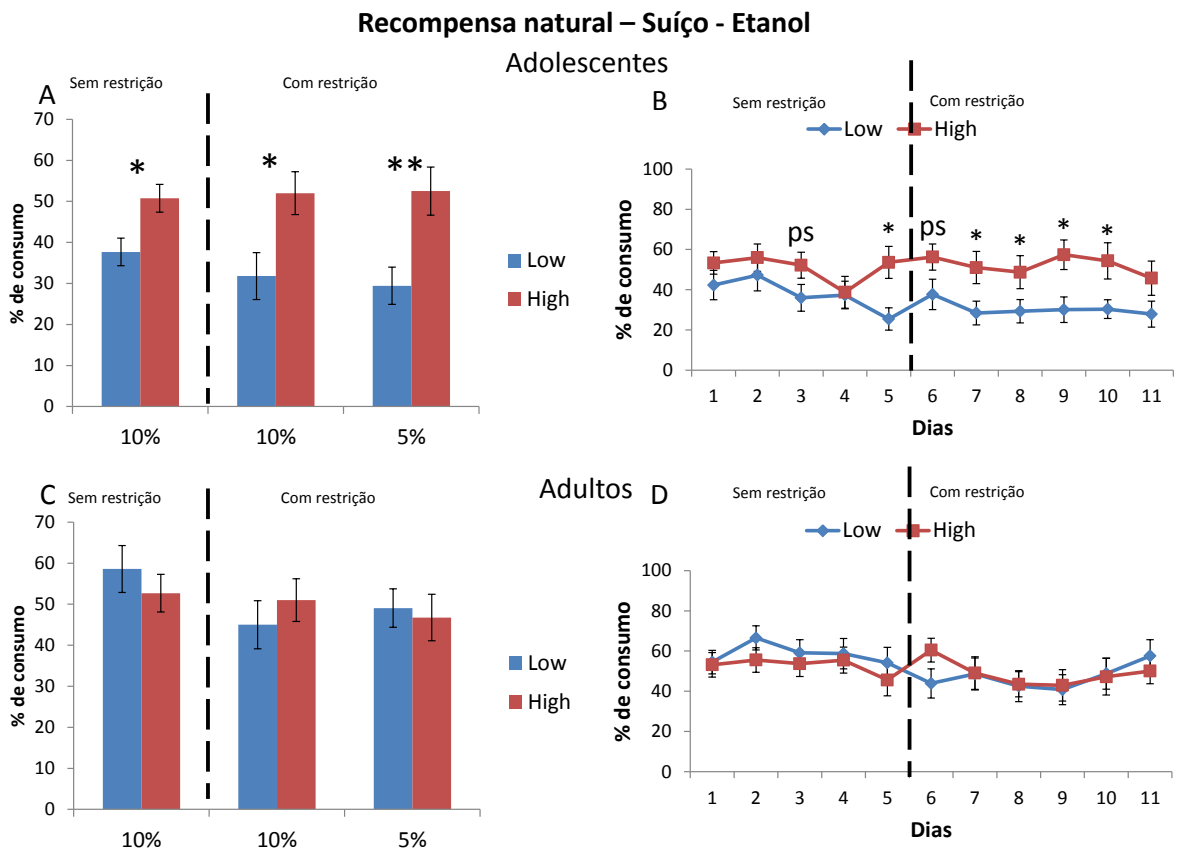

Figura 27 – Efeito da resposta à recompensa natural no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). PS = próximo da significância, P = 0,07; * P < 0,05; ** P < 0,01.

Os animais adolescentes da cepa C57BL/6 com alto consumo de sacarose também apresentam maior consumo de etanol quando não há o estresse por privação de líquidos (10% sem restrição, $F_{(1,25)} = 2,7$, $P = 0,05$; Figura 28A e B). Em adultos animais com alto consumo de sacarose também apresentam maior consumo de etanol, mas neste caso somente quando há o estresse por privação de líquidos (10% sem restrição, $F_{(1,47)} = 4,3$, $P < 0,05$; Figura 28C).

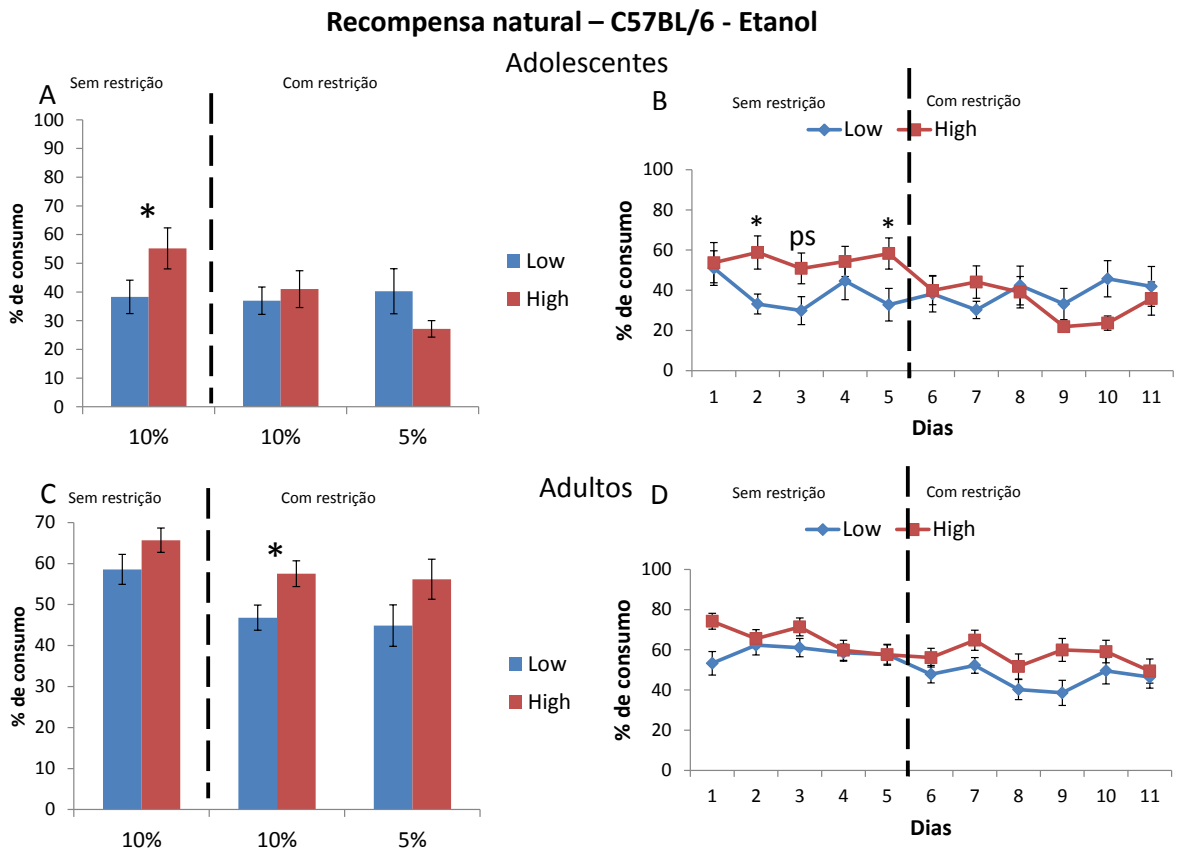

Figura 28 – Efeito da resposta à recompensa natural no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). PS = próximo da significância, P = 0,07; * P < 0,05.

3.4.3. Efeito do comportamento de busca pela novidade

Em relação ao consumo de nicotina, os níveis de busca pela novidade avaliada através do número de buracos explorados no teste do campo vazado não foi fator relevante para nenhuma das cepas em qualquer idade (Suíços, Figura 29; C57BL/6, Figura 30). Da mesma forma, no presente trabalho o nível de busca pela novidade não serviu como fenótipo preditor do consumo de etanol em ambas as cepas em qualquer idade (Suíços, Figura 31; C57BL/6, Figura 32).

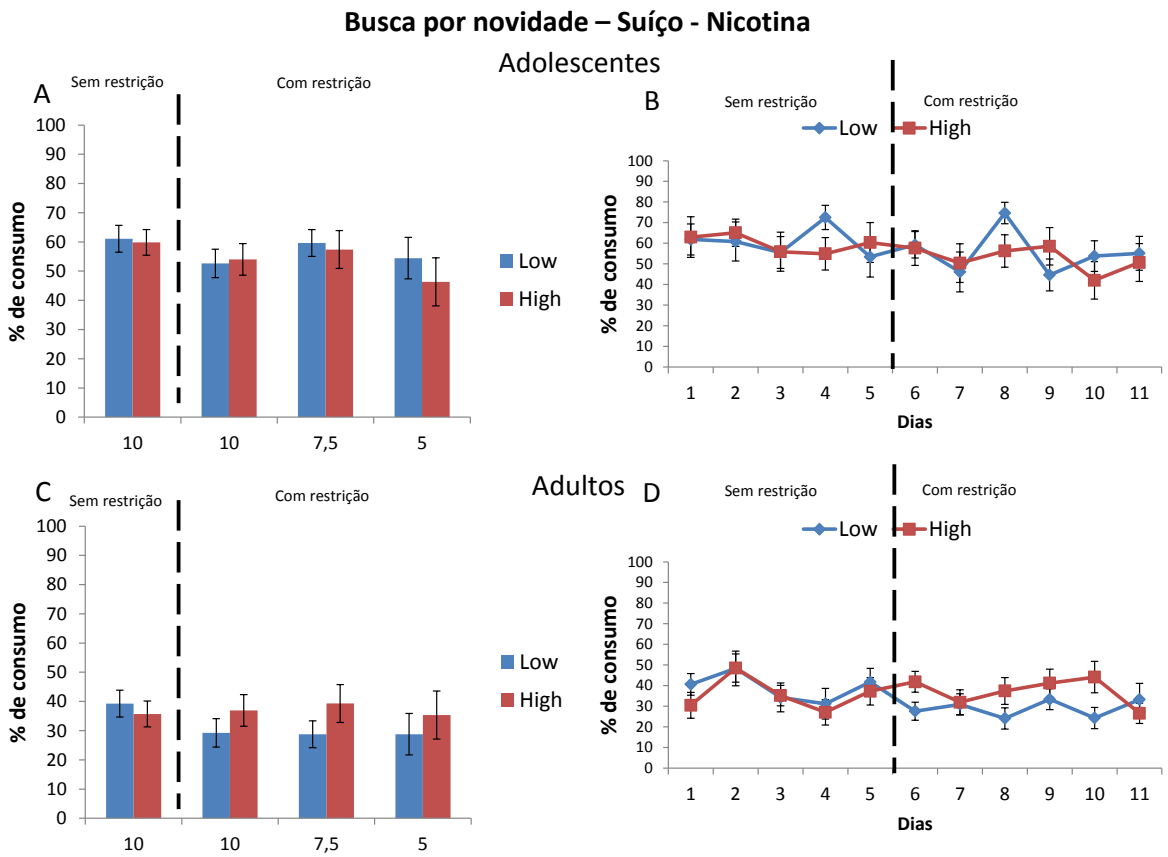

Figura 29 – Efeito dos níveis de busca por novidade no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

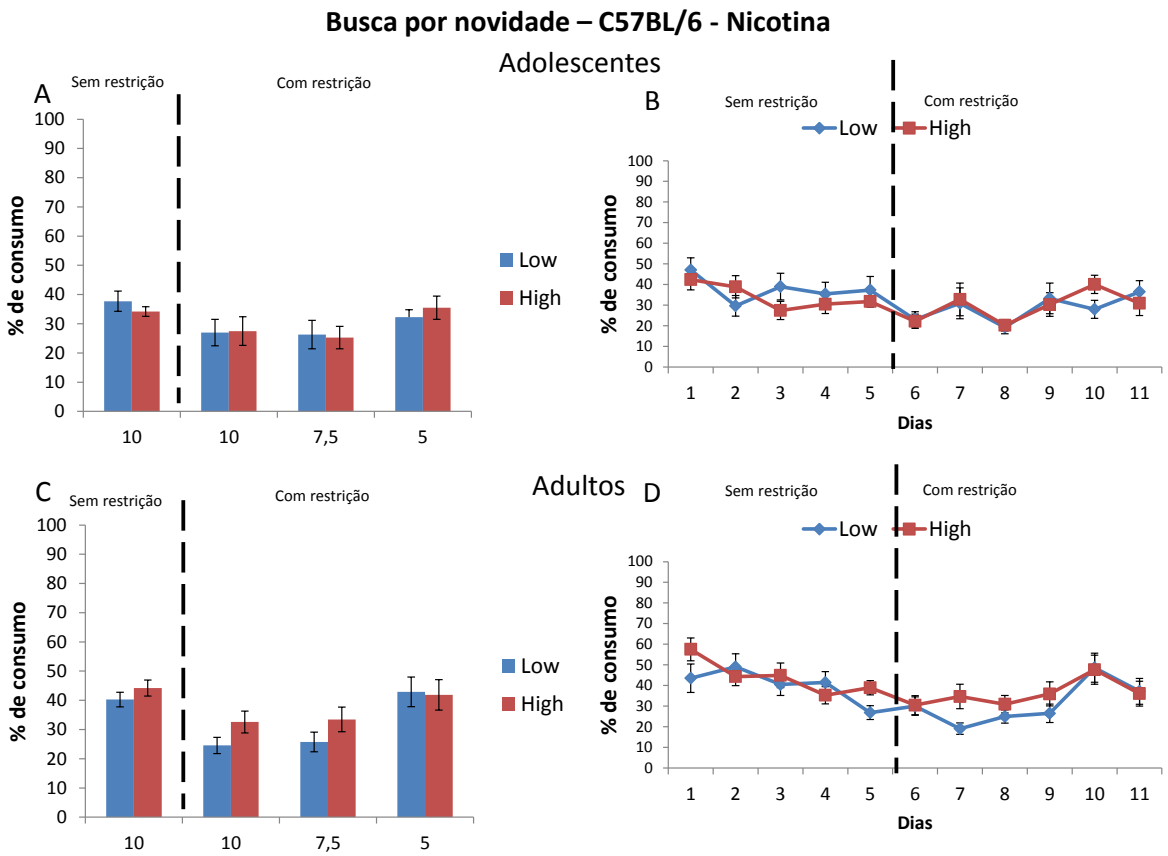

Figura 30 – Efeito dos níveis de busca por novidade no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

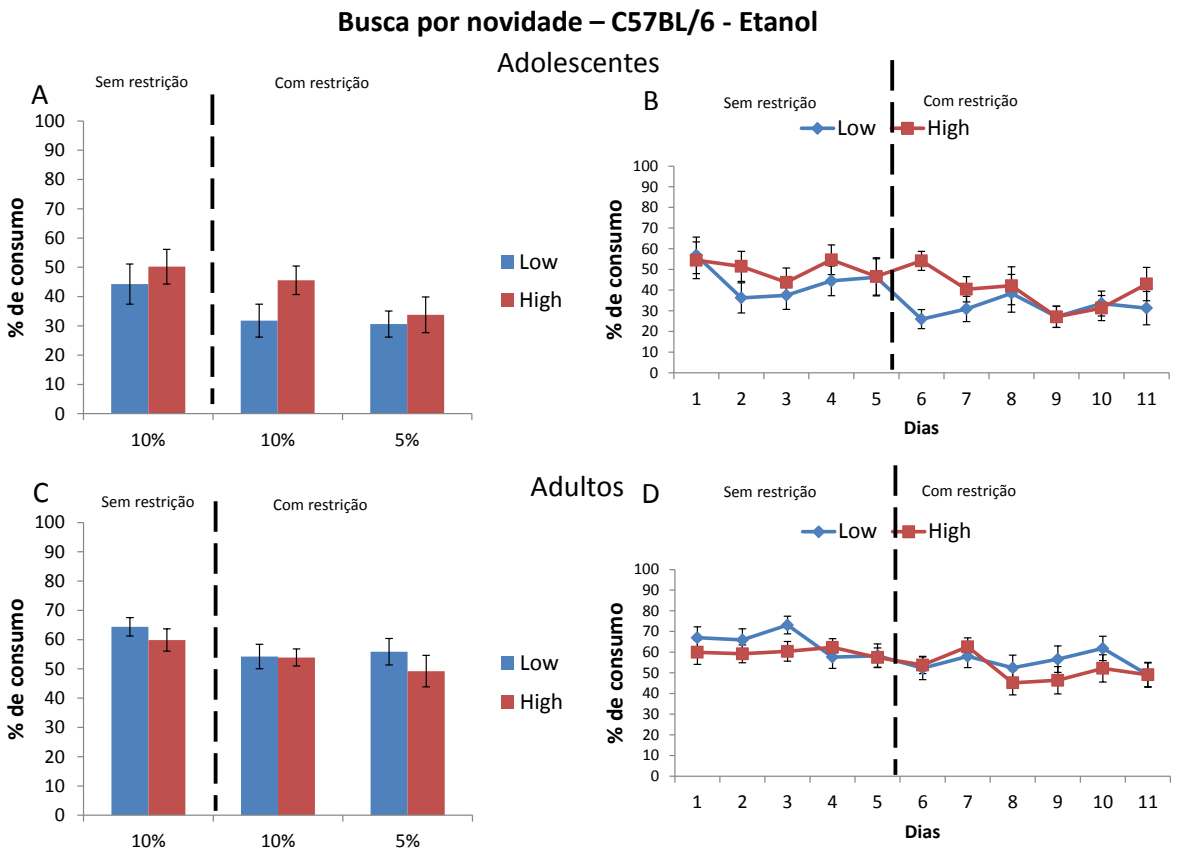

Figura 31 – Efeito dos níveis de busca por novidade no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

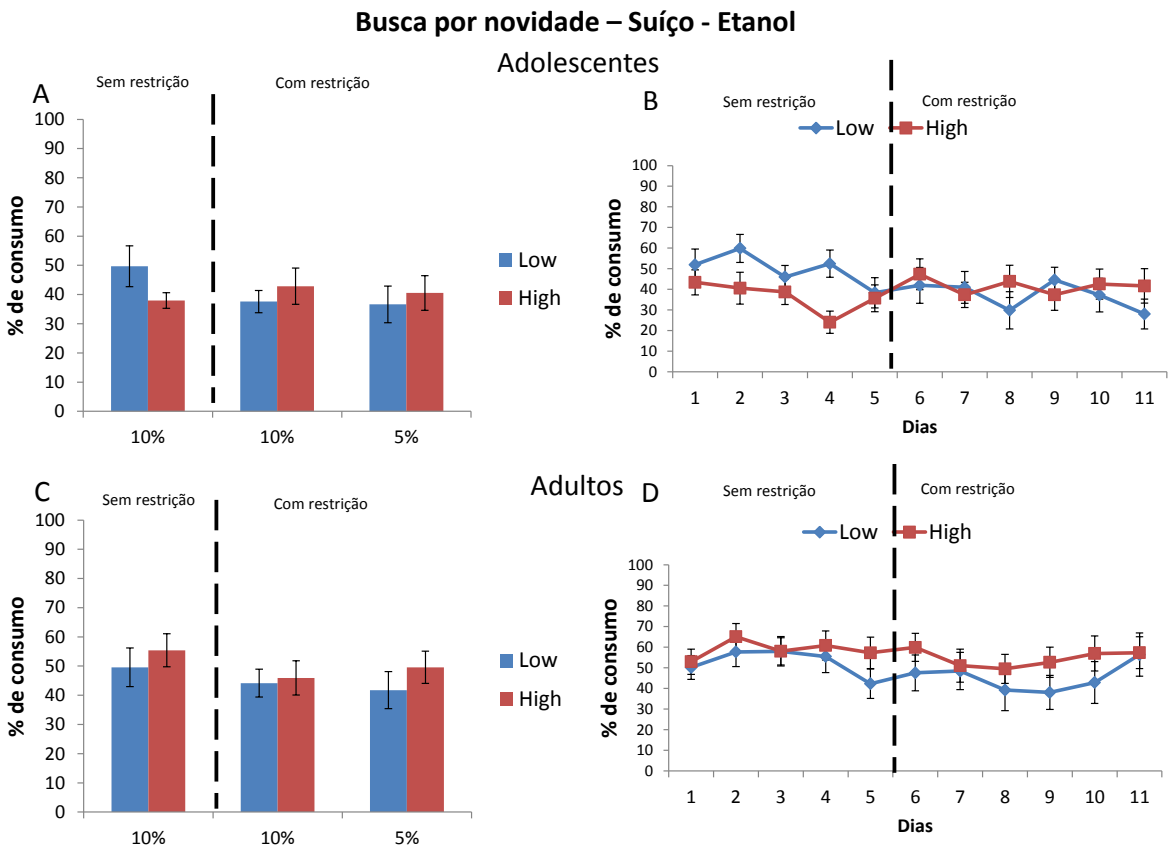

Figura 32 – Efeito dos níveis de busca por novidade no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

3.4.4. Efeito do comportamento associado à ansiedade

O nível prévio de ansiedade foi fator significante para determinar o consumo de nicotina na cepa Suíça apenas em animais adolescentes (Figura 33A e B). Nesta idade animais com elevados níveis de ansiedade (baixo % de tempo nos braços abertos) apresentam maior consumo de nicotina quando não há estresse por restrição de líquidos ($F_{(1,29)} = 3,4$, $P < 0,05$). Em animais adultos desta cepa os níveis prévios de ansiedade não foram relevantes em nenhuma dose e/ou condição (Figura 33C e D).

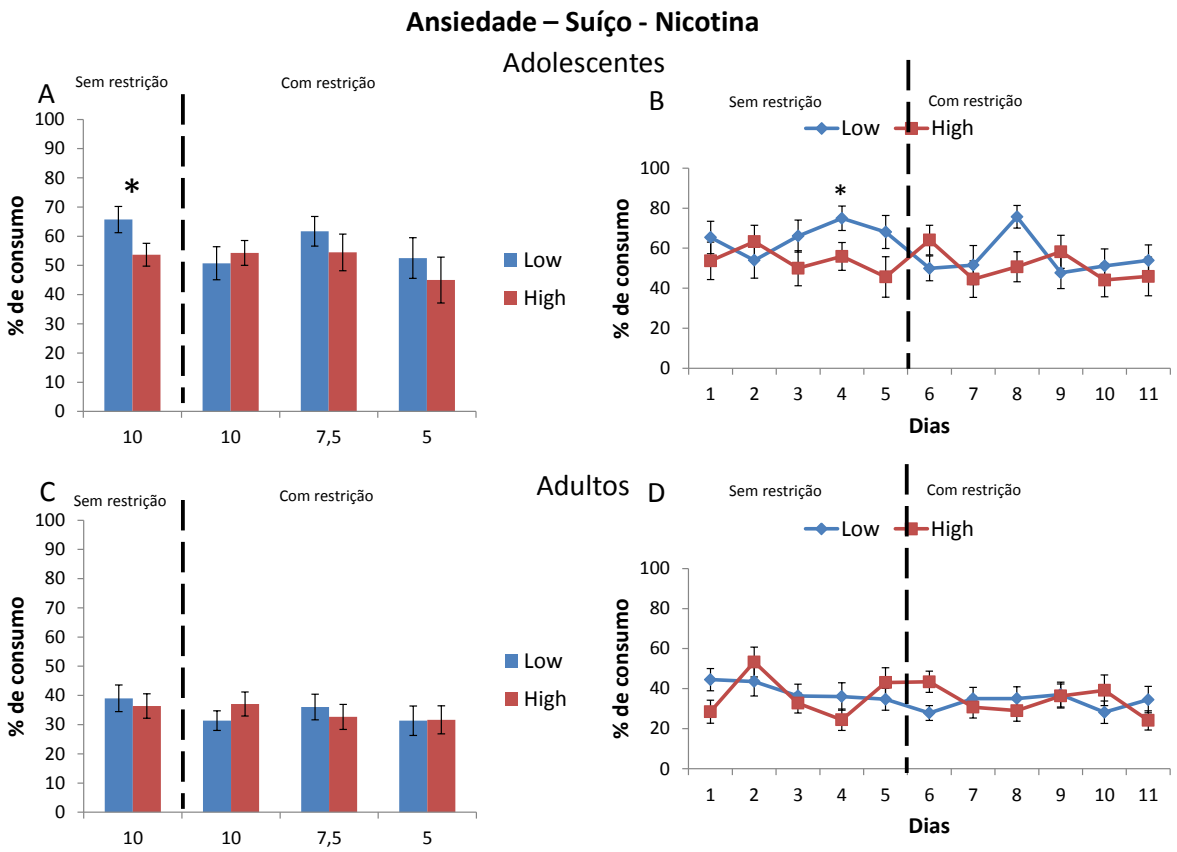

Figura 33 – Efeito da ansiedade no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). * P < 0,05.

De forma oposta, na cepa C57BL/6 não observamos efeito dos níveis de ansiedade no consumo de nicotina em animais adolescentes (Figura 34A e B). Em adultos observamos efeito dos níveis de ansiedade, mas apenas em uma dose e condição ($F_{(1,30)} = 5,1$, $P < 0,05$), na qual animais com baixo níveis de ansiedade apresentam maior consumo de nicotina na dose de 10 µg/ml no modelo de restrição de líquido (Figura 34C). Vale ressaltar que neste caso a análise a posteriori por dias indicou que apenas no primeiro dia após abstinência (6º dia de teste de escolha) esse efeito foi significativo (Figura 34D).

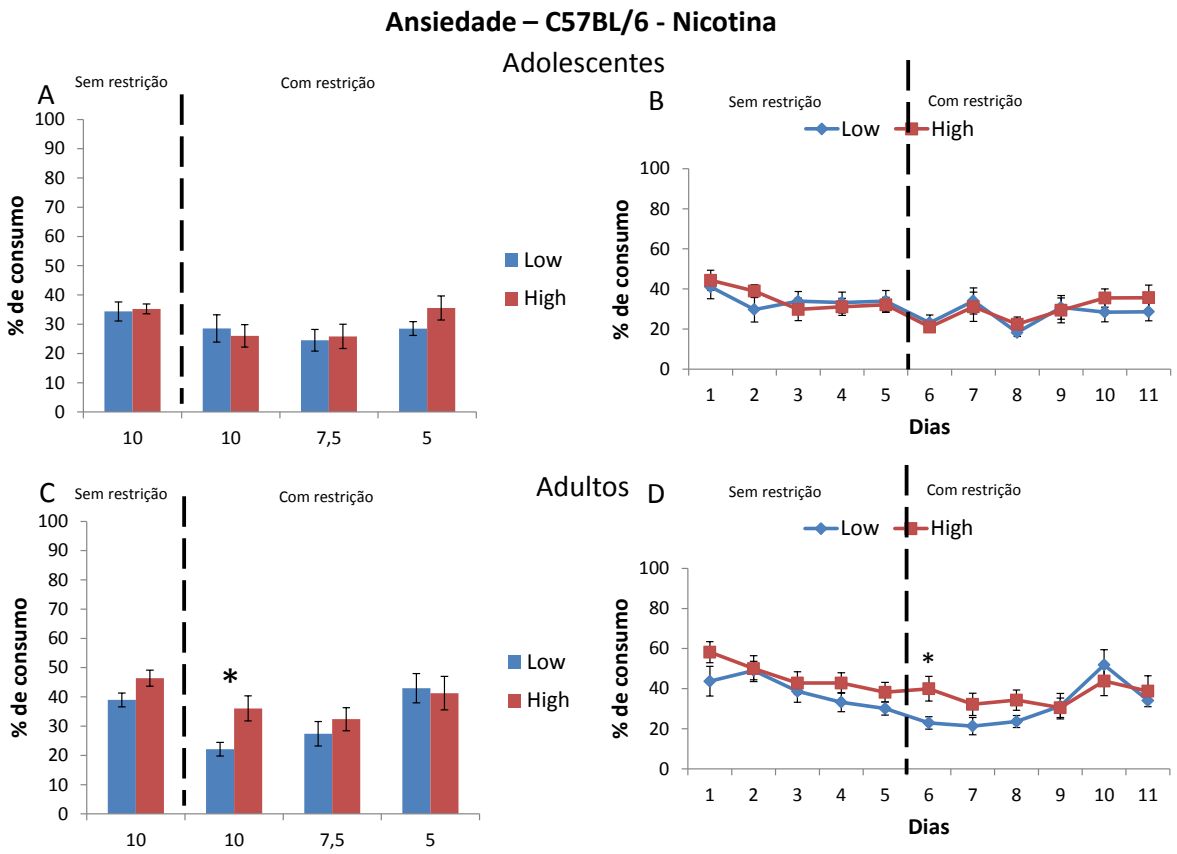

Figura 34 – Efeito da ansiedade no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). * P < 0,05.

Em relação ao consumo de etanol, os níveis de ansiedade avaliados através do percentual de tempo nos braços abertos não foi fator relevante para nenhuma das cepas em qualquer idade (Suíços, Figura 35; C57BL/6, Figura 36).

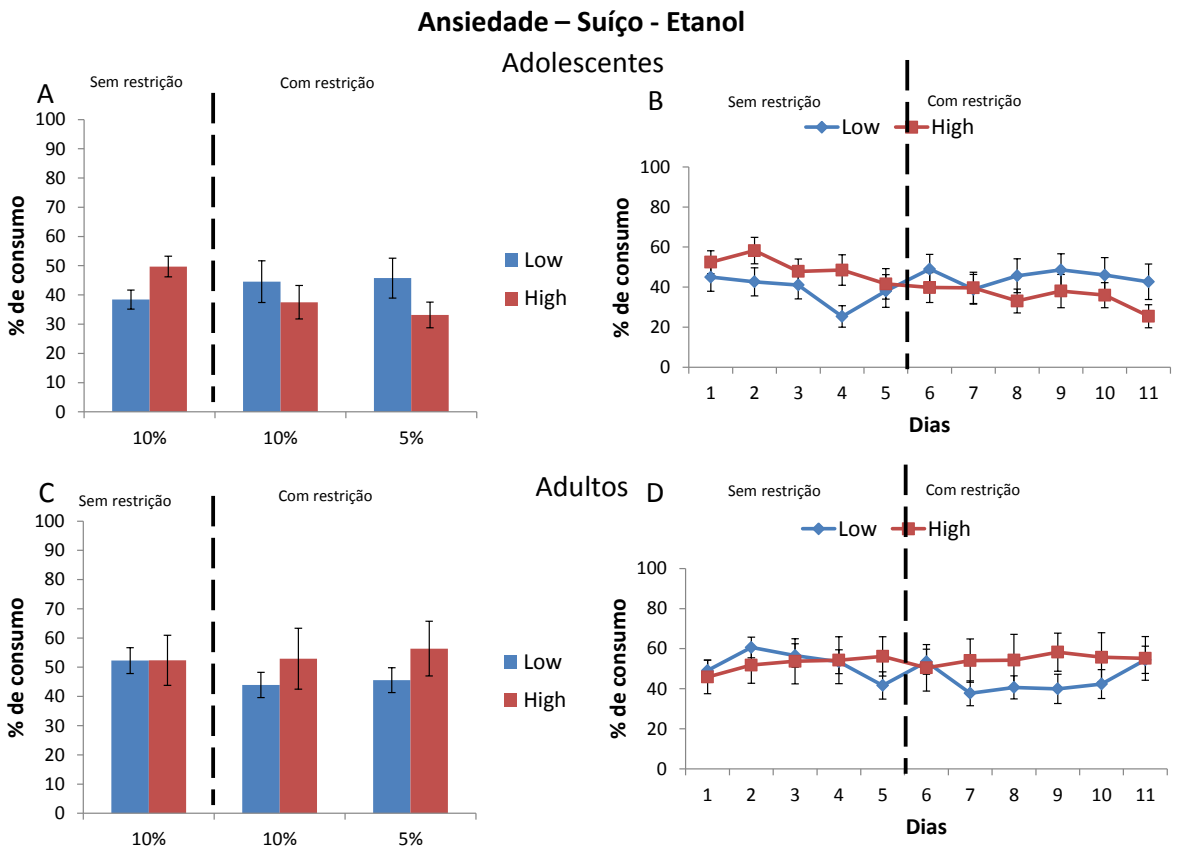

Figura 35 – Efeito da ansiedade no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

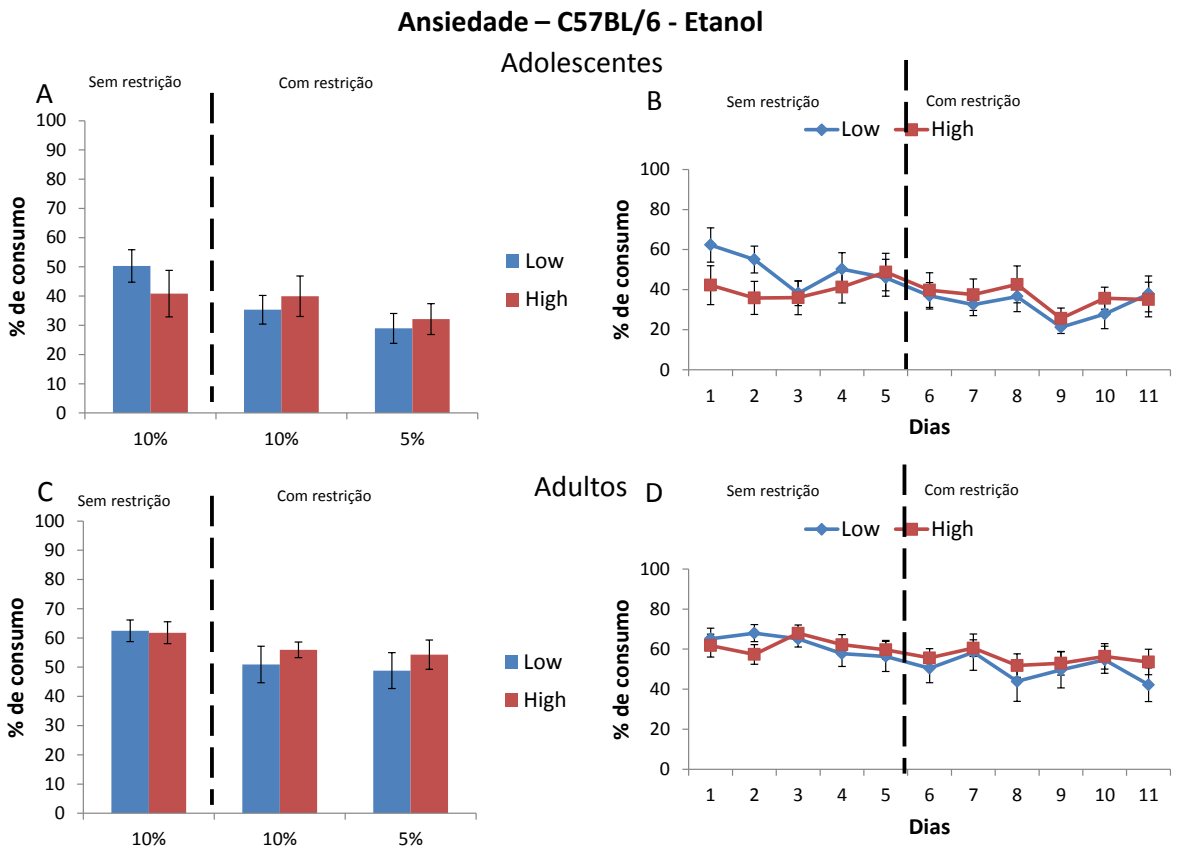

Figura 36 – Efeito da ansiedade no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

3.4.5. Efeito do comportamento de tomada de decisão

A avaliação do comportamento de tomada de decisão pelo tempo de permanência do animal no centro do aparelho do Labirinto em Cruz Elevado indicou que este fenótipo comportamental pode estar relacionado ao consumo de etanol em animais adolescentes quando não há estresse por restrição de líquidos. No entanto, os dados divergiram entre as cepas utilizadas no presente estudo. Animais adolescentes da cepa Suíça que apresentam menor tempo de tomada de decisão possuem maior consumo de etanol ($F_{(1,30)} = 4,4$, $P < 0,05$; Figura 37A e B), já animais adolescentes da cepa C57BL/6 ocorre o oposto ($F_{(1,21)} = 4,6$, $P < 0,05$; Figura 38A e B). Em animais adultos de ambas as cepas nenhum efeito foi observado (Suíço, Figura 37C e D; C57BL/6, Figura 38C e D).

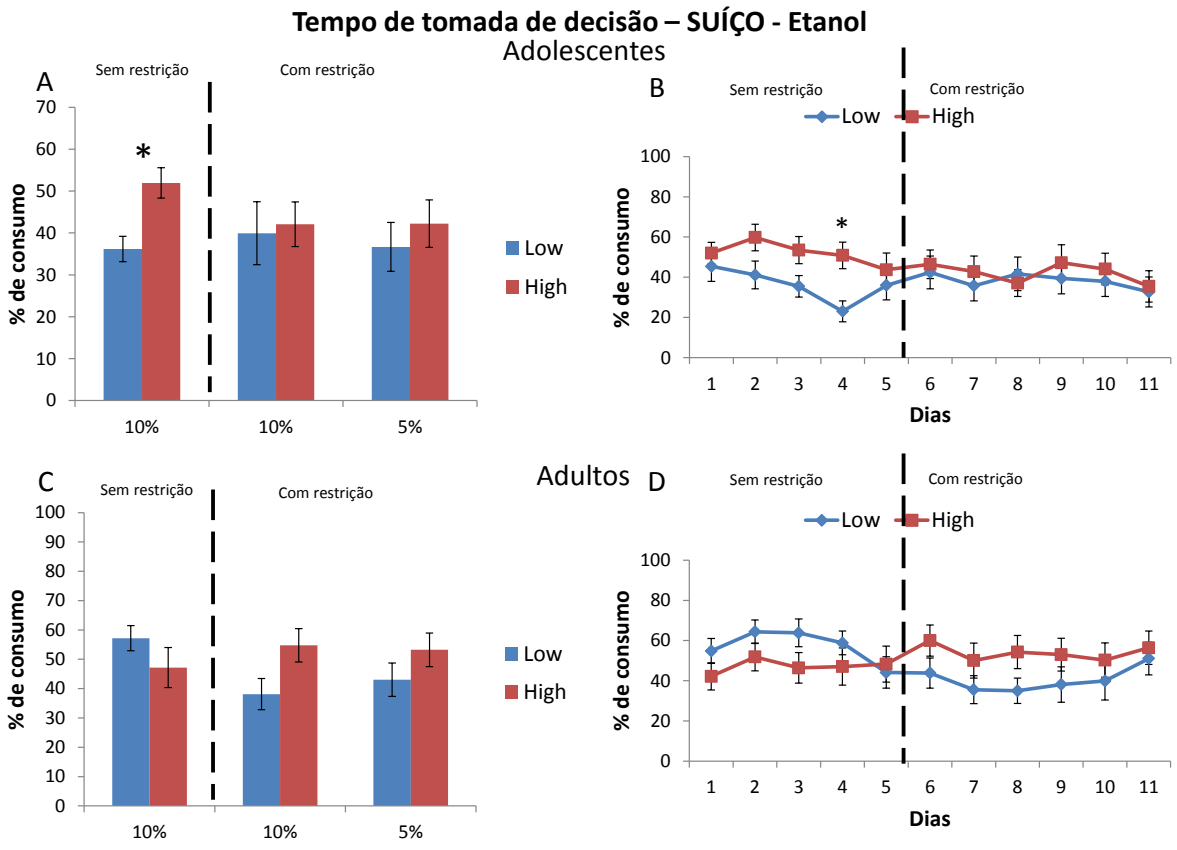

Figura 37 – Efeito do tempo de tomada de decisão no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). * P < 0,05

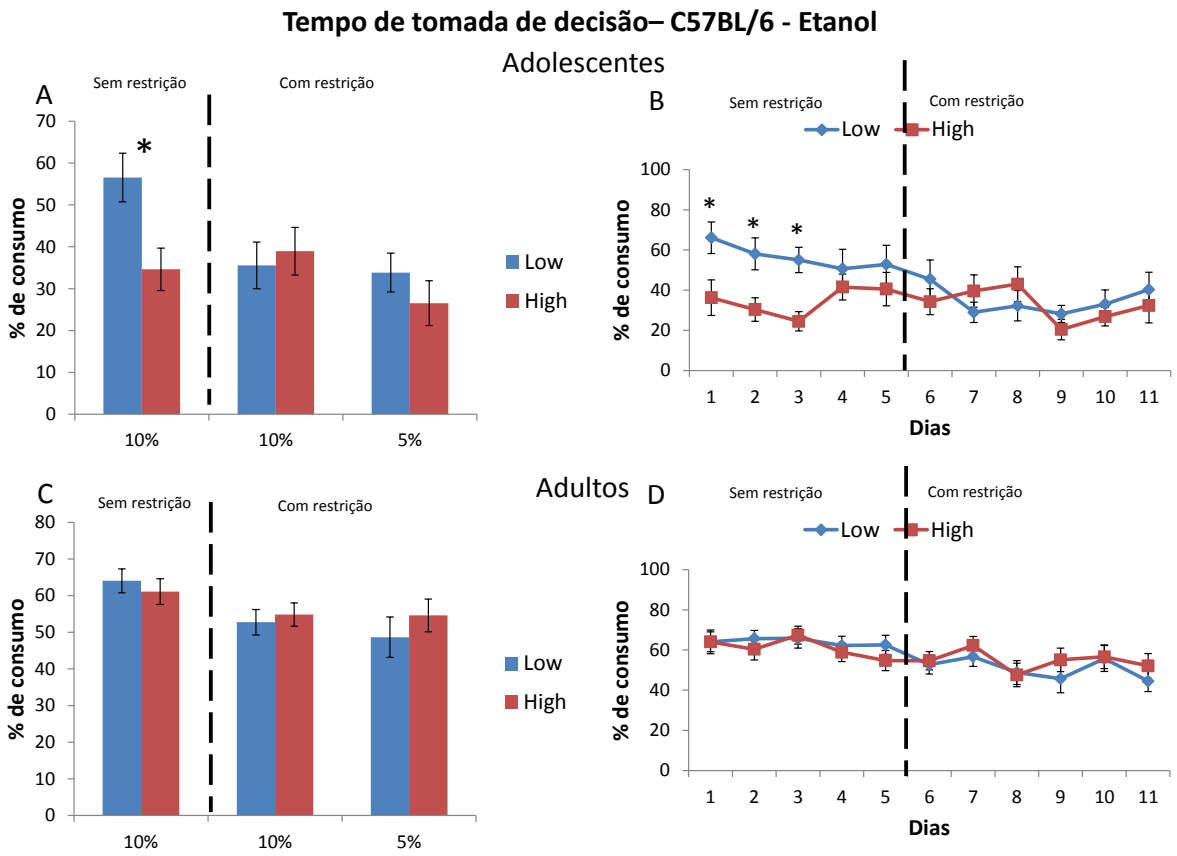

Figura 38 – Efeito do tempo de tomada de decisão no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). *P < 0,05

Em relação ao consumo de nicotina, o comportamento de tomada de decisão pelo tempo de permanência do animal no centro do aparelho do Labirinto em Cruz Elevado não foi fator relevante para nenhuma das cepas em qualquer idade (Suíços, Figura 39; C57BL/6, Figura 40).

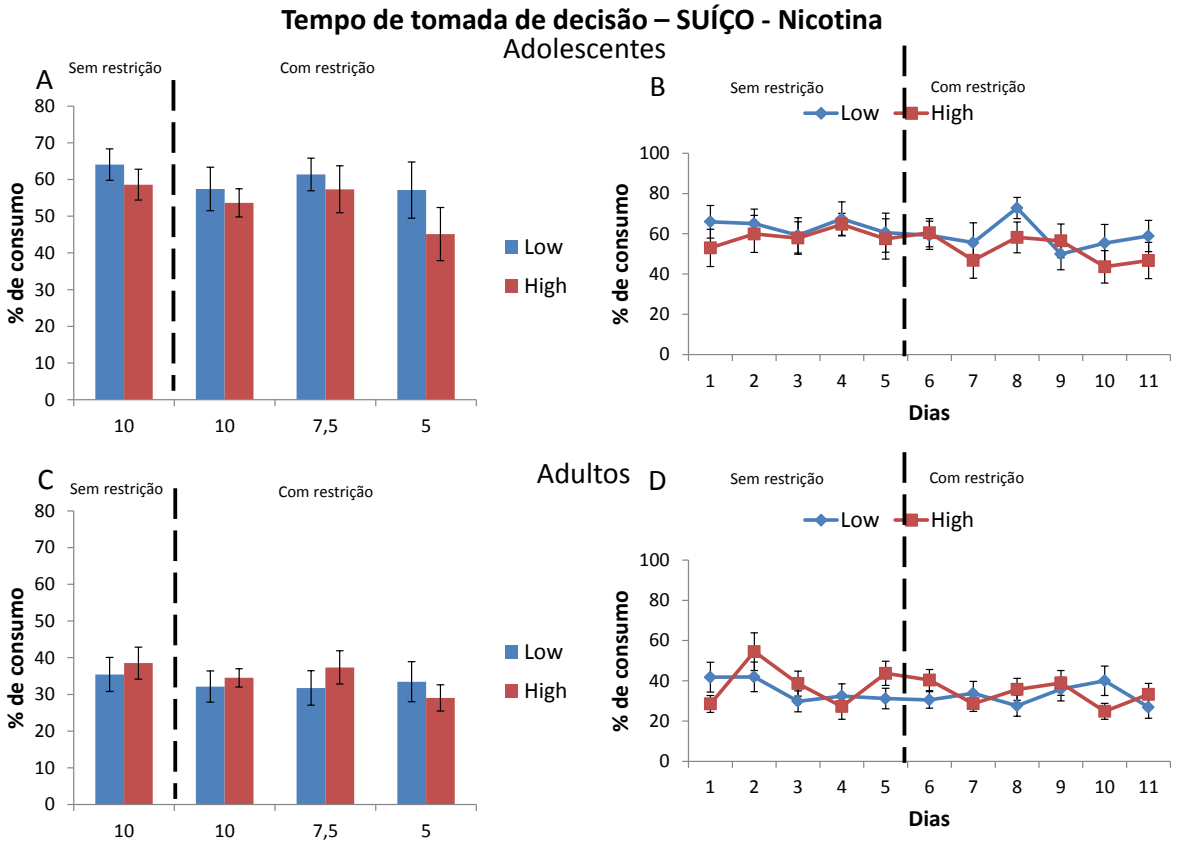

Figura 39 – Efeito do tempo de tomada de decisão no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

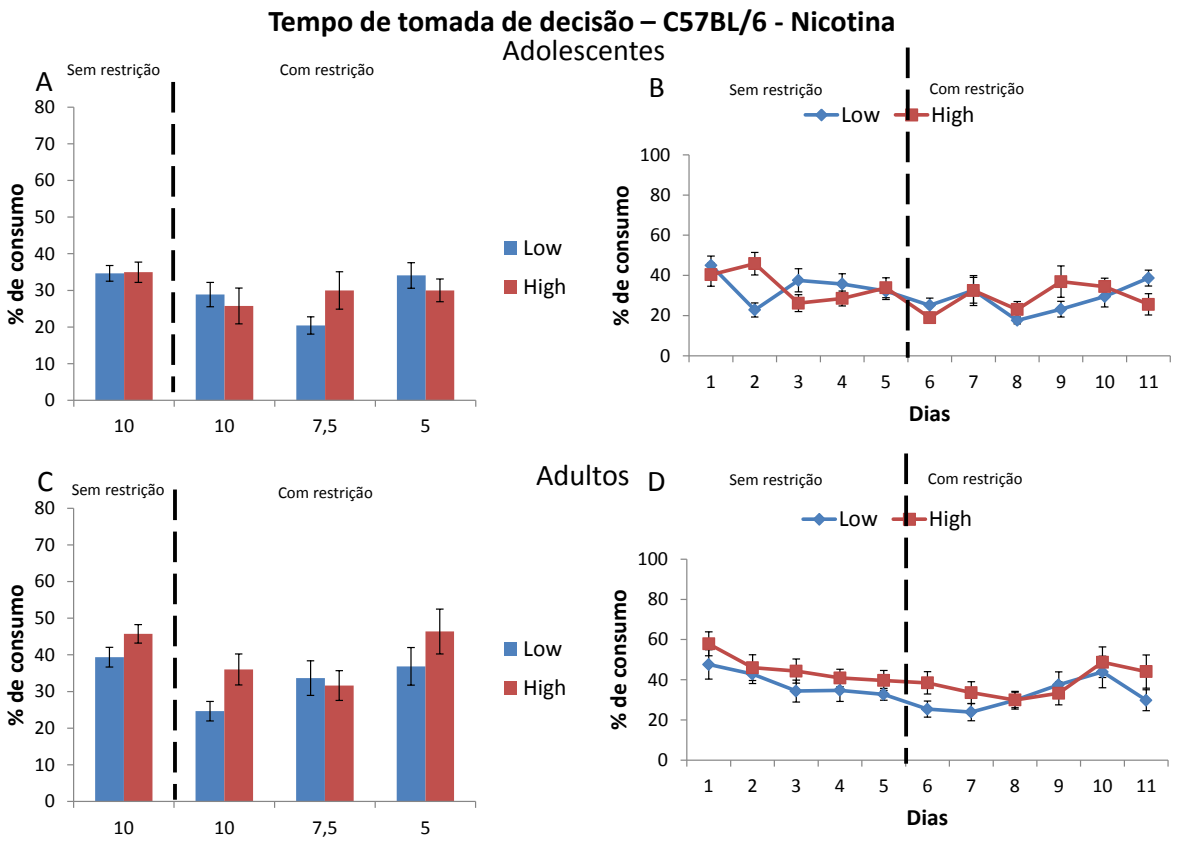

Figura 40 – Efeito do tempo de tomada de decisão no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

3.4.6. Efeito do comportamento de avaliação de risco

O comportamento de risco foi avaliado pelo número de *stretching* para o braço aberto do teste do Labirinto em Cruz Elevado. O comportamento de risco só foi relevante para animais da cepa C57BL/6 adolescentes em relação ao consumo de etanol. Em relação ao consumo de nicotina nenhum efeito significativo foi observado (Suíços, Figura 41; C57BL/6, Figura 42).

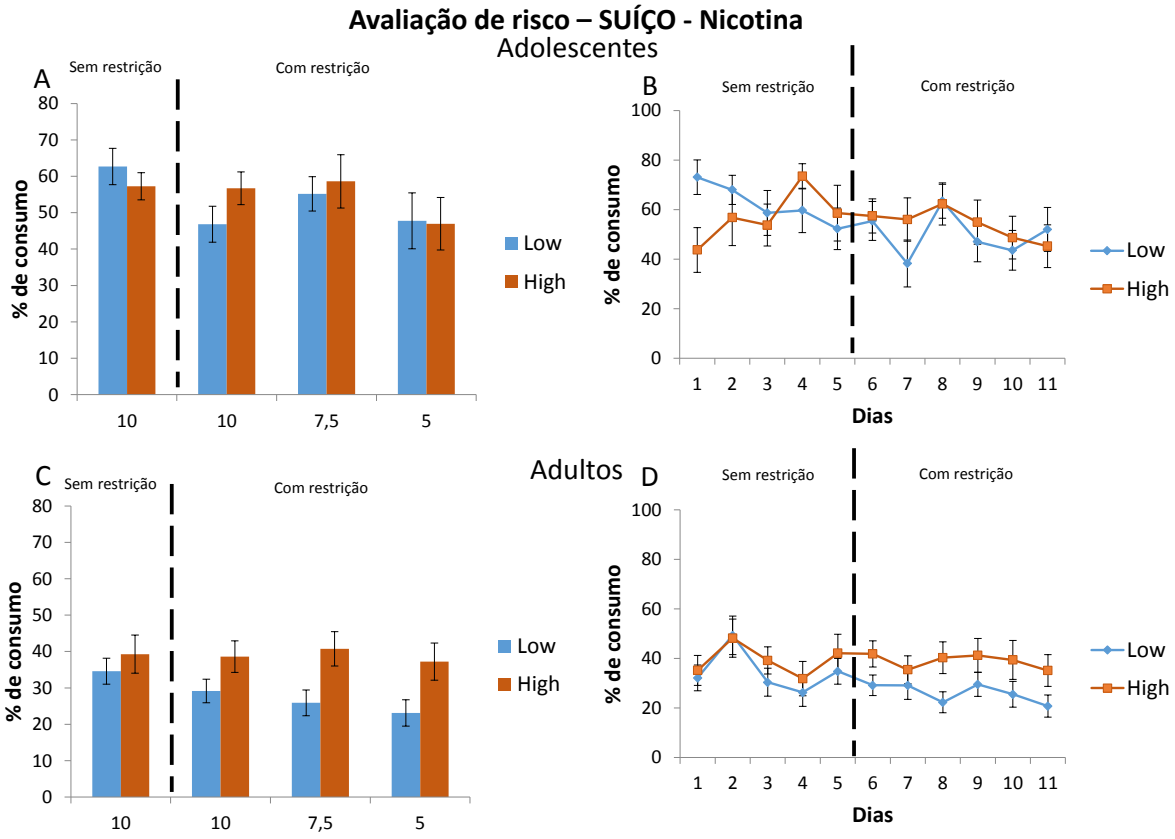

Figura 41 – Efeito do comportamento de avaliação de risco no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

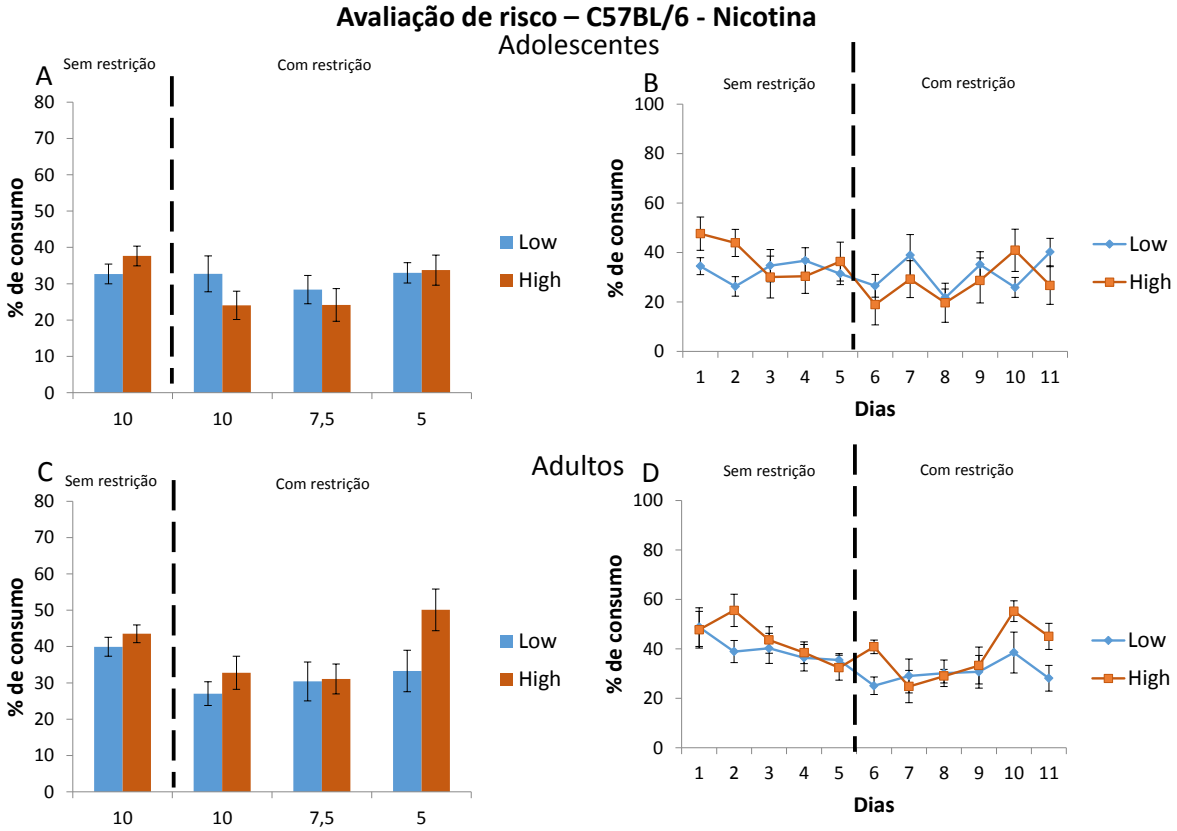

Figura 42 – Efeito do comportamento de avaliação de risco no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

Em relação ao consumo de etanol, como mencionado anteriormente, o comportamento de avaliação de risco só foi relevante em animais da cepa C57BL/6. Animais adolescentes desta cepa que apresentam baixo nível de avaliação de risco tendem a apresentar maior consumo de etanol quando não há estresse de privação de líquidos ($F_{(1,18)} = 3,5$, $P = 0,07$; Figura 44A e B).

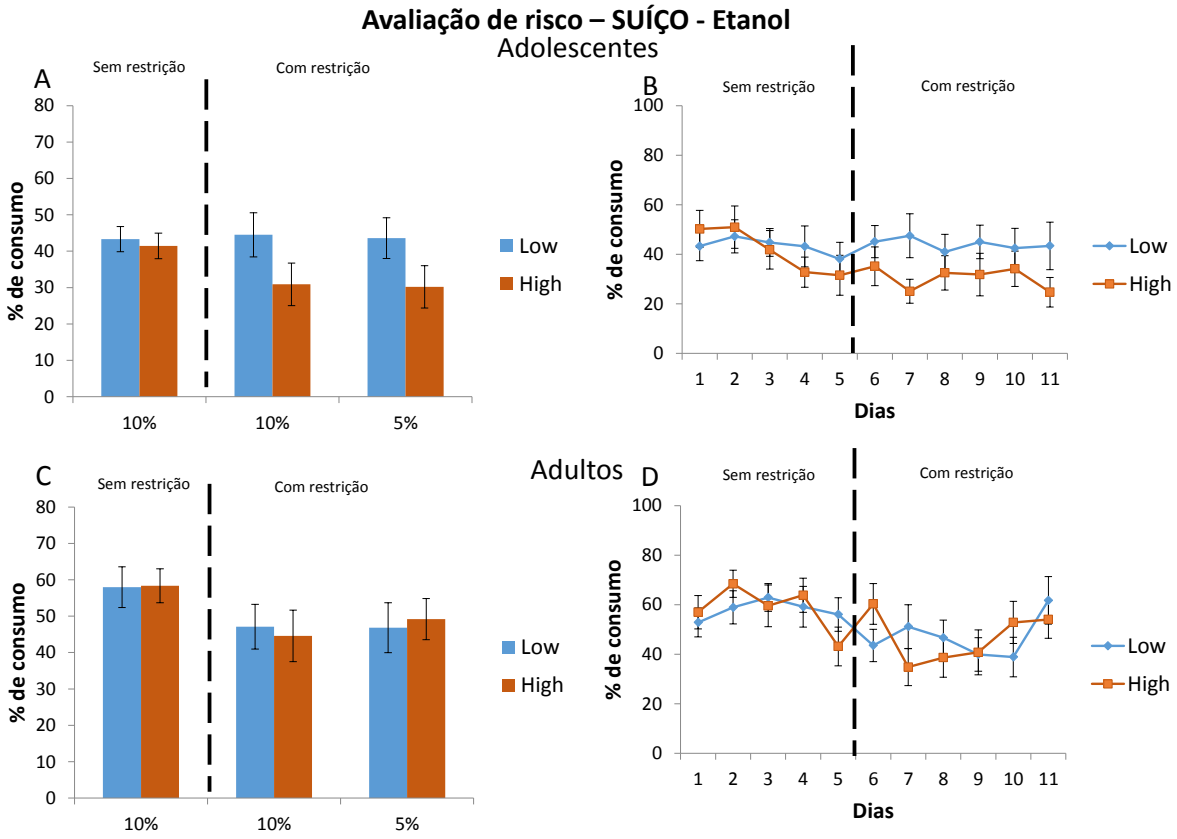

Figura 43 – Efeito do comportamento de avaliação de risco no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

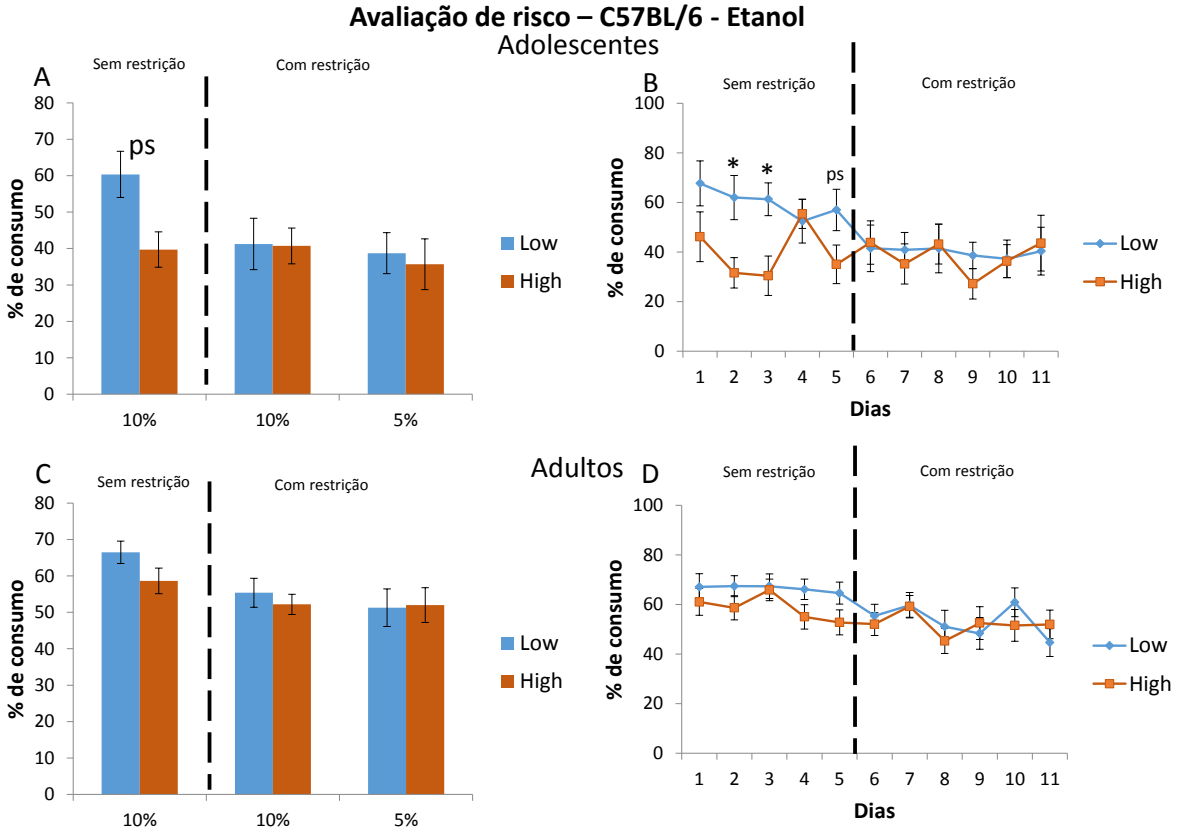

Figura 44 – Efeito do comportamento de avaliação de risco no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). PS = 0,07; * P < 0,05

3.4.7. Efeito do comportamento no teste do nado forçado

O comportamento no teste do nado forçado não foi relevante para o consumo de nicotina em nenhuma das condições estudadas, como pode ser observado nas Figuras 45 (Cepa Suíça) e 46 (Cepa C57BL/6).

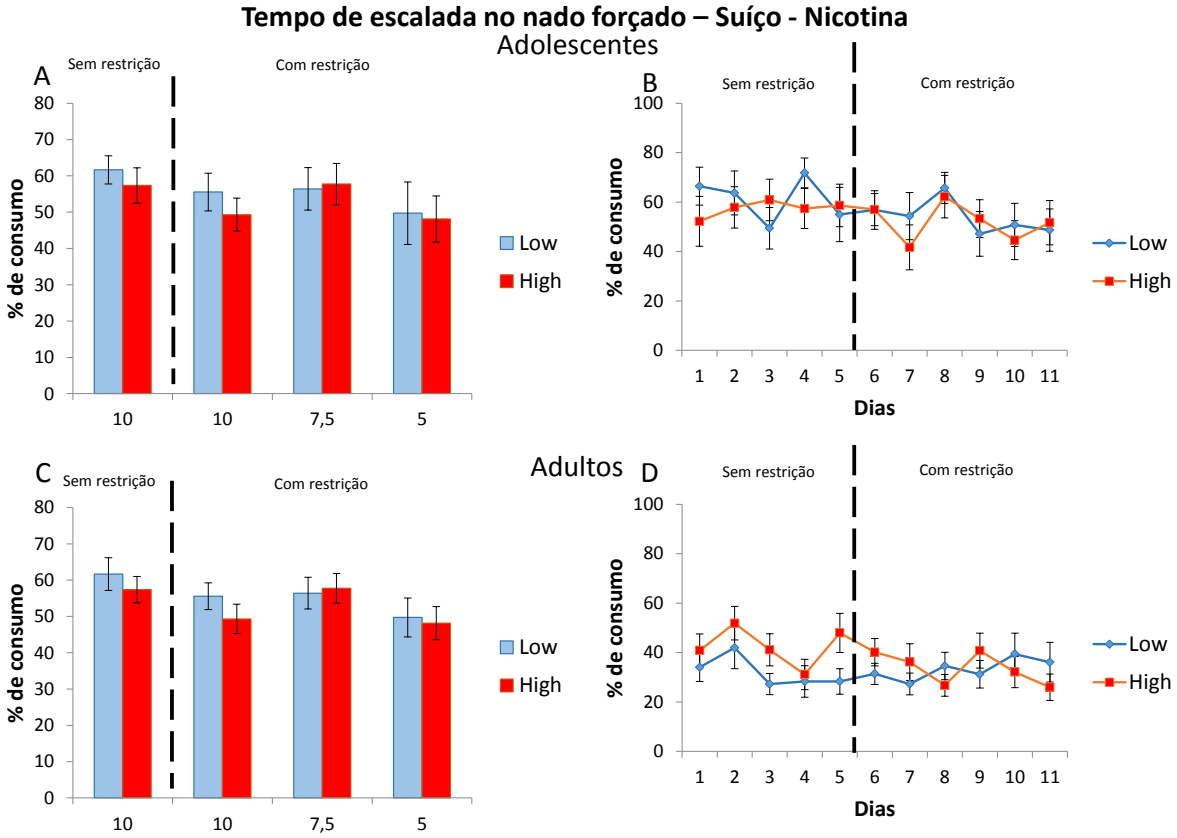

Figura 45 – Efeito do comportamento de escalada no nado forçado no consumo de nicotina em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

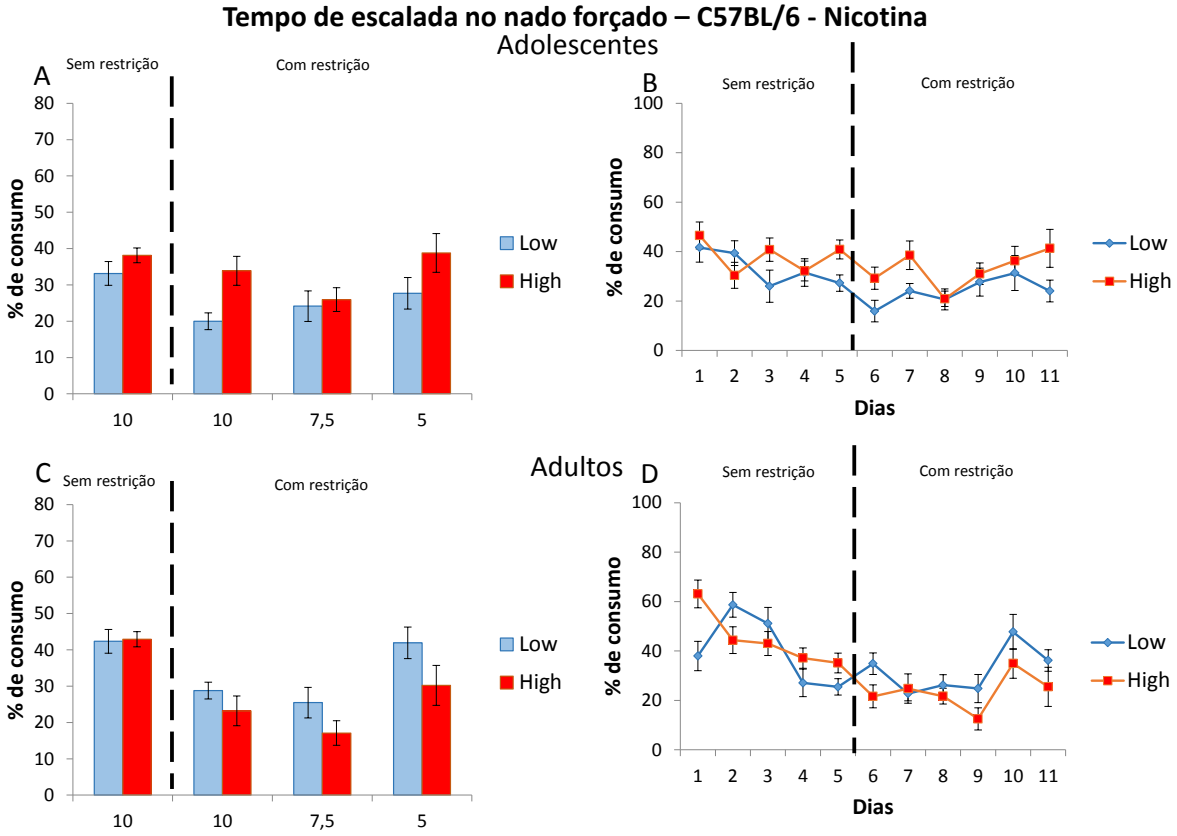

Figura 46 – Efeito do comportamento de escalada no nado forçado no consumo de nicotina em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

Em relação ao consumo de etanol, o comportamento em animais adultos foi relevante para a cepa *inbred*. Animais adultos C57BL/6 que apresentam maior tempo de escalada possuem maior consumo de etanol quando não há estresse por privação de líquidos ($F_{(1,48)}$ = 9,2, P < 0,01; Figura 48A e B). Em animais Suíços, o comportamento no nado forçado não foi relevante (Figura 47).

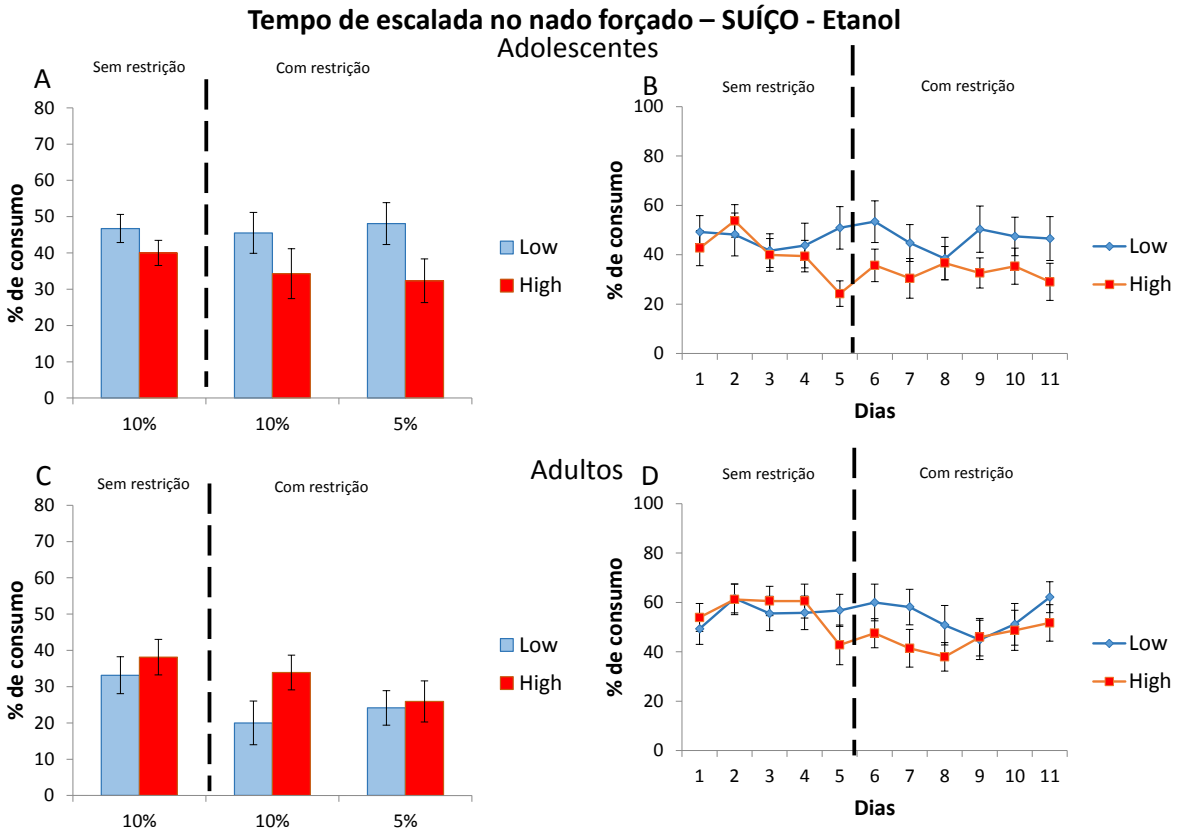

Figura 47 – Efeito do comportamento de escalada no nado forçado no consumo de etanol em animais da cepa Suíça em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D).

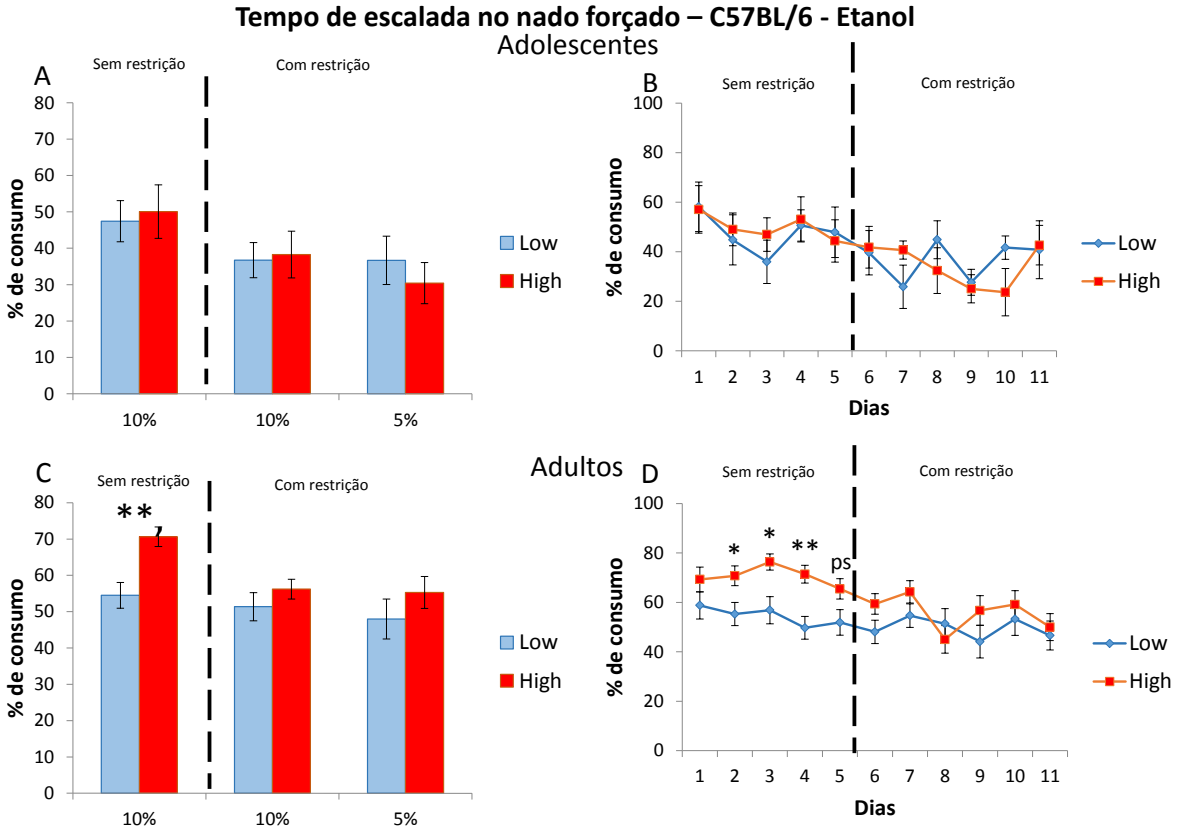

Figura 48 – Efeito do comportamento de escalada no nado forçado no consumo de etanol em animais da cepa C57BL/6 em adolescentes (A e B) e adultos (C e D) considerando modelo do teste e dose (A e C) ou ao longo dos dias de avaliação (B e D). * P < 0,05; ** P < 0,01

4. **DISCUSSÃO**

4.1. **Resumo dos resultados**

4.1.1. Comparações no consumo das drogas entre cepas e idade

Em relação ao consumo de nicotina, observamos que os animais adolescentes da cepa Suíça consomem mais nicotina independente da dose utilizada e da disponibilidade de líquidos quando comparados com a cepa C57BL/6. Quando adultos, o efeito de cepa deixa de existir. Animais adolescentes da cepa Suíça consomem mais nicotina quando comparados com os adultos. Já na cepa C57BL/6 animais adultos apresentam maior consumo que adolescentes principalmente na dose de 10 µg/ml quando não há restrição de líquidos. Quanto ao consumo de etanol, em ambas as cepas os animais adultos apresentam maior consumo de etanol quando comparados aos adolescentes. Nos animais adultos da cepa C57BL/6, tal diferença aparece em ambos modelos e doses estudadas. Já nos animais adultos da cepa Suíça esta diferença se apresenta significativa quando utilizamos o modelo sem o estresse de privação de líquido com dose de 10% de etanol. Em resumo, as comparações no consumo das drogas entre as idades são apresentadas na tabela 4. Em relação ao modelo de escolha entre duas garrafas, os nossos resultados indicaram que em nosso modelo de estudo a restrição de líquido não foi capaz de aumentar o consumo de ambas as drogas, sugerindo que o estresse da restrição não intensificou a busca pela recompensa gerada pelas drogas. Da mesma forma, a preferência pelo consumo também não aumentou em função da redução da concentração da droga disponibilizada, indicando que não ocorreu o padrão "*fading*" de consumo.

Tabela 4 – Comparações no consumo das drogas entre idades.

TABELA 4			
		NICOTINA	**ETANOL**
PN40	**SUÍÇOS**	↑	↓
	C57BL/6	↓	↓
PN120	**SUÍÇOS**	↓	↑
	C57BL/6	↑ (10 µg/ml, sem restrição)	↑

↑: aumento; ↓: diminuição; -: sem diferenças

4.1.2. Comparações nos comportamentos entre cepas e idade

Para o comportamento de busca pela novidade nossos dados mostram que em ambas as cepas animais adolescentes apresentam comportamento de busca pela novidade mais intenso quando comparados com adultos. Além disso, observamos que animais Suíços apresentam maior comportamento de busca pela novidade que animais C57BL/6.

Para o comportamento social, os animais adultos apresentam maior nível de sociabilidade. Porém, evidenciamos que para a cepa C57BL/6 os efeitos são influenciados pelo sexo, onde apenas animais machos adultos apresentam maior sociabilidade que machos adolescentes. Também observamos efeito da cepa, animais Suíços apresentam maior sociabilidade quando comparados aos C57BL/6.

Observamos no estudo do comportamento no teste do Labirinto em Cruz Elevado que animais Suíços possuem maior resposta ansiogênica. A idade também foi fator determinante da resposta comportamental associada à ansiedade. Em ambas as cepas animais adolescentes possuíram menor comportamento associado à ansiedade. Em relação ao comportamento de *stretching*, animais C57BL/6 apresentam menor número quando comparados com Suíços. Além disso, em nossa análise observamos interação significativa entre Cepa e Período. Animais

C57BL/6 não apresentam diferença entre as idades estudadas, porém, adolescentes apresentam maior número de *stretching* quando comparados aos adultos em camundongos Suíços. De modo geral, animais Suíços possuem maior tempo de permanência no centro do equipamento. Porém este efeito é determinado pelo maior tempo no centro presente entre animais adolescentes.

Para o comportamento associado a resposta a recompensas naturais, apesar de não encontramos efeitos significativos da cepa ou da idade, encontramos em animais Suíços uma interação entre os fatores Idade e Sexo. Neste caso, animais adultos fêmeas possuem maior percentual de consumo de sacarose quando comparado aos adolescentes.

Em relação ao teste do nado forçado, nossos dados indicam efeito de cepa para todas as variáveis estudadas. Animais Suíços apresentaram menor tempo de escalada, maiores tempos de nado e não apresentaram comportamento de imobilidade. Além disso, observamos uma interação entre Cepa e Idade para tempo de escalada e tempo de nado. A idade só foi relevante em animais da cepa Suíça. Neste caso, animais adolescentes apresentam maior tempo realizando o comportamento de escalada e menor tempo de nado quando comparado a animais adultos.

A tabela 5 apresenta de forma resumida as comparações nos comportamentos entre as diferentes idades.

Tabela 5 – Comparações nos comportamentos entre idades.

TABELA 5				
	PN40		**PN120**	
	SUÌÇOS	**C57BL/6**	**SUÌÇOS**	**C57BL/6**
Comportamento de busca pela novidade	↑	↑	↑	↓
Comportamento social	↑	↑	↑	↑ Machos
Comportamento associado a ansiedade	↓	↓	↑	↑
Stretching	↑	↑	↑	↓
Comportamento associado à resposta a recompensas naturais	↑ Fêmeas	–	↓ Fêmeas	–
Comportamento associado ao teste do nado forçado	↑	↑	↑	↓

↑: aumento; ↓: diminuição; -: sem diferenças

4.1.3. Resumo dos resultados de susceptibilidade de consumo

Considerando o efeito da sociabilidade, pudemos observar que a sociabilidade afetou o consumo de nicotina somente na cepa Suíça, de forma que os adolescentes Suíços caracterizados com baixa sociabilidade apresentam no geral maiores consumo de nicotina. Em adultos não observamos qualquer efeito para essa variável. Em relação aos animais C57BL/6, não observamos nenhum efeito da sociabilidade no consumo de nicotina tanto em adolescentes quanto em adultos. Em relação ao consumo de etanol, os níveis de sociabilidade não afetaram o consumo de etanol em animais adolescentes Suíços. Em adultos observamos uma tendência

a um maior consumo de etanol na condição sem estresse de privação de líquido em animais com altos níveis de sociabilidade. Da mesma forma ao observado para a nicotina, os níveis de sociabilidade não afetaram o consumo de etanol em animais *inbred* C57BL/6 tanto em adolescentes quanto em adultos.

Considerando o efeito da resposta a recompensa natural, pudemos observar que em relação ao consumo de nicotina não houve diferenças entre os grupos com alto ou baixo consumo de sacarose em animais Suiços adolescentes ou adultos. Em animais da cepa C57BL/6, o consumo de nicotina foi maior em animais adolescentes com baixo perfil de consumo de sacarose quando não há estresse por restrição de líquidos. Em animais adultos, não observamos efeitos significativos. Animais Suíços adolescentes com o perfil de grande procura por recompensa natural apresentam maior consumo de etanol em todas as condições e doses estudadas. Em animais adultos não há efeito do perfil de procura por recompensas naturais no consumo de etanol em ambas as cepas. Os animais adolescentes da cepa C57BL/6 com alto consumo de sacarose também apresentam maior consumo de etanol quando não há o estresse por privação de líquidos. Em adultos animais com alto consumo de sacarose também apresentam maior consumo de etanol, mas neste caso somente quando há o estresse por privação de líquidos.

Considerando o efeito do comportamento associado à ansiedade, o nível prévio de ansiedade foi fator significante para determinar o consumo de nicotina na cepa Suíça apenas em animais adolescentes. Nesta idade, animais com elevados níveis de ansiedade apresentam maior consumo de nicotina quando não há estresse por restrição de líquidos. Em animais adultos desta cepa, os níveis prévios de ansiedade não foram relevantes em nenhuma dose e/ou condição. De forma oposta, na cepa C57BL/6 não observamos efeito dos níveis de ansiedade no consumo de nicotina em animais adolescentes. Em adultos observamos efeito dos níveis de ansiedade, onde animais com baixos níveis de ansiedade apresentam maior consumo de nicotina na dose de 10 µg/ml no modelo de restrição de líquido. Em relação ao consumo de etanol, os níveis de ansiedade avaliados não foi fator relevante para nenhuma das cepas em qualquer idade.

A avaliação do comportamento de tomada de decisão, avaliado pelo tempo de permanência do animal no centro do aparelho do labirinto em cruz elevado, indicou que este fenótipo comportamental pode estar relacionado ao consumo de etanol em animais adolescentes quando não há estresse por restrição de líquidos. Animais adolescentes da cepa Suíça que apresentam menor tempo de tomada de decisão possuem maior consumo de etanol, já animais adolescentes da cepa C57BL/6 ocorre o oposto. Em animais adultos de ambas as cepas nenhum

efeito foi observado. Em relação ao consumo de nicotina, o comportamento de tomada de decisão não foi fator relevante para nenhuma das cepas em qualquer idade.

O comportamento de risco, em relação ao consumo de etanol, só foi relevante para animais C57BL/6 adolescentes. Animais que apresentam baixo nível de avaliação de risco tendem a apresentar maior consumo de etanol quando não há estresse de privação de líquidos. Em relação ao consumo de nicotina nenhum efeito significativo foi observado.

Considerando o efeito do comportamento de busca pela novidade, pudemos observar em relação ao consumo de nicotina e ao consumo de etanol que os níveis de busca pela novidade avaliada através do número de buracos explorados no teste do campo vazado não foi fator relevante para nenhuma das cepas em qualquer idade.

Considerando o efeito do comportamento no teste do nado forçado, esse comportamento não foi relevante para o consumo de nicotina em nenhuma das condições estudadas, como pode ser observado nas cepas estudadas. Em relação ao consumo de etanol, o comportamento em animais adultos foi relevante para a cepa *inbred*. Animais adultos C57BL/6 que apresentam maior tempo de escalada possuem maior consumo de etanol quando não há estresse por privação de líquidos. Em animais Suíços, o comportamento no nado forçado não foi relevante.

Tabela 6 – Comparações na susceptibilidade de consumo entre idades.

TABELA 6					
		SUÍÇOS		**C57BL/6**	
		PN40	**PN120**	**PN40**	**PN120**
Efeito da sociabilidade	**Nicotina**	↑ (Baixa)	–	–	–
	Etanol	–	↑ (Alta)	–	–
Efeito da resposta a recompensa natural	**Nicotina**	–	–	↑ (Baixa)	–
	Etanol	↑ (Alta)	–	↑ (Alta)	↑ (Alta)
Efeito do comportamento associado à ansiedade	**Nicotina**	↑ (Alto)	–	–	↑ (Baixo)
	Etanol	–	–	–	–
Efeito do comportamento de tomada de decisão	**Nicotina**	–	–	–	–
	Etanol	↑ (Baixo)	–	↑ (Alta)	–
Efeito do comportamento de avaliação de risco	**Nicotina**	–	–	–	–
	Etanol	–	–	↑ (Baixo)	–
Efeito do comportamento de busca pela novidade	**Nicotina**	–	–	–	–
	Etanol	–	–	–	–
Efeito do comportamento no teste do nado forçado	**Nicotina**	–	–	–	–
	Etanol	–	–	–	↑ (Alta)

↑: aumento; ↓: diminuição; -: sem diferenças

4.2. **Discussão da comparação entre as cepas**

Neste projeto foram utilizados camundongos de duas cepas diferentes: a cepa Suíça e a cepa C57BL/6. Animais de cepas *outbred*, como a cepa Suíça, apresentam na constituição genética uma alta heterozigose, o que permite a manutenção numa mesma colônia uma grande diversidade genética; enquanto animais de cepas *inbred*, como a cepa C57BL/6, provém de cruzamentos consanguíneos com um altissimo índice de homozigose, o que torna tais animais os mais idênticos possíveis que se pode obter e que a propagação da linhagem sempre tente diminuir ao máximo a divergência genética. Ou seja, o genótipo de cepas *outbred* manifesta maior variabilidade genética quando comparado com cepas *inbred.* Se a variabilidade genética é uma força estabilizadora na determinação dos fenótipos, a variabilidade observada em animais Suíços pode ser considerada uma fuga desses mecanismos estabilizadores (Tuttle *et al*., 2018).

Em nossos experimentos encontramos que os animais *outbred* Suíços adolescentes consumiram mais nicotina que adultos da mesma cepa. Considerando que muitos estudos em humanos já consolidaram a ideia que indivíduos adolescentes possuem consumo com perfil abusivo mais frequente e que possuem maior probabilidade de se tornarem adictos do tabaco (Grant *et al*., 2004), nossos dados sugerem que a cepa Suíça pode representar um melhor modelo que represente a resposta em humanos. Além disso, não encontramos diferenças significativas nas variâncias entre as cepas para as variáveis estudadas, o que vai de encontro com a ideia de que animais *inbred* são mais "estáveis" em relação ao seu fenótipo pelo menos para as variáveis utilizadas no presente estudo.

4.3. **Discussão da comparação entre idades**

A adolescência é um período de transição entre a infância e a fase adulta, sendo nesse período onde frequentemente é iniciado o uso de drogas (Spear, 2016). Durante essa janela de desenvolvimento, o cérebro fica mais sensível a novas experiências devido sua plasticidade (Yuan *et al.*, 2015). O álcool e outras drogas exercem muitos de seus efeitos através da ação em áreas como as regiões mesolímbicas e corticais frontais, passando por remodelações particularmente marcantes durante a adolescência. Assim, o estado de maturação dessas regiões poderia influenciar a propensão à experimentação e ao uso continuado de drogas durante a

adolescência (Spear, 2016). Entretanto, estas mesmas diferenças neurobiológicas podem resultar nos jovens maiores níveis de conflito com os pais e a formação de amizades afiliativas com outros jovens com alto risco de abuso de drogas. Neste sentido, o uso de modelos animais permite avaliar a susceptibilidade ao uso das drogas sem a influência das questões sociais. O presente estudo demonstrou em ambas as cepas que animais adolescentes apresentam características fenotípicas típicas, como maior comportamento de busca por novidade, menores níveis de ansiedade e maior perseverança em situação aversiva (*coping* no teste do nado forçado). Além disso, observamos características fenotípicas que tornaram o animal adolescente mais susceptível ao consumo das drogas estudadas.

O sistema dopaminérgico também está criticamente envolvido nos efeitos reforçadores das drogas de abuso e no estabelecimento da dependência (Thomsen *et al*., 2011). O sistema dopaminérgico, em particular, experimenta uma reorganização profunda durante a adolescência que é importante para o desenvolvimento de comportamentos motivadores e aprendizagem associativa (O'Donnell, 2010; Wahlstrom *et al*., 2010). Logo, é na adolescência que encontramos a fase crucial de susceptibilidade ao uso de drogas, sendo um período sensível para o amadurecimento de circuitos cerebrais que regulam a cognição e a emoção, como resultado, temos a vulnerabilidade aos efeitos da nicotina e do tabaco (Yuan, 2015). Talvez por isso, observamos em nossos resultados que os camundongos adolescentes, independentemente da dose e da restrição ou não de líquidos, foram maiores consumidores de nicotina do que os camundongos adultos. Além disso, podemos perceber que de modo geral as características fenotípicas comportamentais estão mais associadas à susceptibilidade ao uso das drogas durante a adolescência do que quando comparado com a idade adulta. A sociabilidade, o perfil de busca por recompensas naturais, o perfil de tomada de decisão e avaliação de risco só foram relevantes no consumo das drogas em animais adolescentes. Nos próximos tópicos apresentaremos a discussão dos possíveis mecanismos envolvidos nestes resultados.

4.4. **Animais adolescentes menos sociáveis consomem mais nicotina**

Em nossos experimentos encontramos que os animais Suíços adolescentes de baixa sociabilidade consumiram mais nicotina. O comportamento de fumar é afetado por uma miríade de fatores ambientais e genéticos. Seu uso é difundido entre os seres humanos adolescentes e adultos, pois facilita as interações sociais, sendo a adolescência a idade mais crítica para o início

do tabagismo (Eissenberg e Balster, 2000). A forte influência do ambiente social na iniciação do tabagismo, especialmente durante a adolescência, está bem documentada com estudos em humanos que revelaram que a maioria dos fumantes iniciou este hábito dentro de um ambiente social e a motivação inicial para consumir tabaco está intimamente ligada ao contexto social (Greenlund *et al*., 1997; Trezza *et al*., 2009; White *et al*., 2008).

Estudos clínicos prospectivos sugeriram que a exposição ao estresse psicossocial durante a adolescência é um importante fator de risco para o início do uso de nicotina (Koval *et al*., 2004; Finkelstein *et al*., 2006). Da mesma forma, interações recíprocas entre drogas de abuso e comportamentos sociais foram amplamente documentadas em estudos em humanos e animais (Young *et al*., 2011). Níveis mais altos de sociabilidade têm sido associados a um maior uso de substâncias (Brook *et al*., 1986; Chassin *et al*., 1993; Jessor e Jessor, 1977), embora em alguns estudos o efeito é oposto (Tarter, 1988; Tarter *et al*., 2002; Wills *et al*., 1994), sugerindo um possível efeito bimodal. A sociabilidade é um componente importante da extroversão, que está associada ao tabagismo em adultos (Gilbert, 1995).

A oxitocina é um neuropeptídio envolvido em comportamentos sociais. Uma ampla gama de estudos mostrou que diferenças individuais nos níveis de ocitocina endógena, polimorfismos do gene do receptor de oxitocina (OXTR) e mesmo ocitocina administrada exogenamente (por exemplo, intranasal) podem influenciar uma série de efeitos relacionados ao domínio social. Além disso, alguns dos resultados têm gerado implicações potenciais para o desenvolvimento atual de novas abordagens clínicas para transtornos mentais associados a déficits sociais, como o transtorno do espectro autista, transtorno de ansiedade social e transtorno de personalidade borderline (Heinrichs *et al*., 2009). Recentemente, a oxitocina demonstrou ter diversos efeitos protetores em múltiplos aspectos relacionados com o abuso de drogas (Stevenson *et al*., 2017). Além disso, a oxitocina demonstrou ser eficaz na redução do consumo, em respostas fisiológicas e comportamentais relacionadas ao etanol (Stevenson *et al*., 2017). Entretanto, em nosso estudo o consumo do etanol não sofreu influência da sociabilidade.

No presente estudo, os animais adolescentes menos sociáveis (não formadores de vínculos) foram os mais vulneráveis e, consequentemente, consumiram mais nicotina. A interação social pode reduzir o consumo de nicotina (Lee *et al*., 2017). Nesse sentido, a baixa sociabilidade pode torná-lo mais susceptível ao seu uso. Nosso estudo indica que o grau de sociabilidade pode ser um fator relevante para determinar o consumo de nicotina em modelos animais de adolescência, bem como sugere que a preferência por maior contato social pode estar associada ao consumo de nicotina em adolescentes. Logo, considerando que o hormônio oxitocina é um importante facilitador da sociabilidade, acreditamos que o sistema

oxitocinérgico desempenhe um papel relevante nestes efeitos. De fato, foi demonstrado supraregulação dos receptores de oxitocina após exposição subcrônica de nicotina na amigdala, região moduladora das respostas emocionais associadas à dependência a nicotina (Zanos *et al*., 2015). Além disso, recentemente foi demonstrado que a administração de oxitocina reduz o consumo de cigarros em adultos fumantes regulares (Van Hedger *et al*., 2018). Tomados em conjunto, podemos elaborar a hipótese do sistema oxitocinérgico possuir papéis dependentes da idade na geração das respostas agudas da nicotina, como também, na sua capacidade de gerar dependência. Futuros estudos que avaliem a influência da oxitocina no consumo de nicotina e seus efeitos nas diferentes idades serão importantes na elucidação desta questão.

4.5. **Animais adolescentes com alta resposta a recompensas naturais consomem mais etanol em ambas as cepas**

No presente estudo, camundongos Suíços adolescentes com o perfil de grande procura por recompensa natural apresentam maior consumo de etanol em todas as condições e doses estudadas, bem como os animais adolescentes da cepa C57BL/6 com alto consumo de sacarose também apresentam maior consumo de etanol quando não há o estresse por privação de líquidos.

Sistemas neurais envolvidos no processamento de recompensas naturais e drogas de abuso mostram uma sobreposição na via de recompensa mesocorticolímbica do cérebro, que são moduladas por sistemas de neurotransmissores e circuitos neurais similares (Krebs *et al*., 2011). Estudos recentes investigaram um possível papel das orexinas na busca de recompensa por alimentos e drogas de abuso, independentemente da privação. Os neurônios orexigenicos estão localizados em uma região limitada do hipotálamo dorsal, consistindo nas áreas hipotalâmicas lateral, perifornical e dorsomedial (de Lecea *et al*., 1998; Peyron *et al*., 1998; Sakurai *et al*., 1998). Esses neurônios projetam-se por todo o cérebro (Sakurai *et al*., 2005; Yoshida *et al*., 2006) e acredita-se que regulam uma ampla gama de funções, incluindo a excitação e a motivação de recompensa (Aston-Jones *et al*., 2010; Li *et al*., 2014; Mahler *et al*., 2014; Sakurai, 2007; Sakurai, 2014). Os neurônios orexigenicos produzem dois peptídeos, orexina-A e orexina-B (de Lecea *et al*., 1998; Sakurai *et al*., 1998). Esses peptídeos se ligam diferencialmente a dois receptores orexigênicos: o receptor OX1R e o receptor OX2R (de Lecea *et al*., 1998; Sakurai *et al*., 1998). O OX1R exibe uma seletividade mais forte para o orexina-

A, enquanto o OX2R exibe uma seletividade aproximadamente igual para o orexina-A e o orexina-B (Sakurai *et al*., 1998). Esses receptores são distribuídos diferencialmente pelo cérebro (Marcus *et al*., 2001) e vários estudos indicaram que provavelmente desempenham papéis diferentes na função e no comportamento fisiológicos (Mahler *et al*., 2012; Mahler *et al*., 2014).

Evidências recentes sugerem um papel dicotômico dos receptores OX1R e OX2R no cérebro. Os receptores OX1R são importantes para os efeitos neurobiológicos que direcionam a busca de morfina (Harris *et al*., 2005; 2007), cocaína (Harris *et al*., 2005; Borgland *et al*., 2006), nicotina (Pasumarthi *et al*., 2006; Hollander *et al*., 2008; Plaza-Zabala *et al*., 2010; 2012) e álcool (Lawrence *et al*., 2006; Dayas *et al*., 2008; Richards *et al*., 2008; Moorman e Aston-Jones, 2009; Jupp *et al*., 2011; Kim *et al*., 2012; Srinivasan *et al*., 2012). Em contraste, os receptores OX2R foram implicados mais fortemente na regulação e excitação do ciclo sono/vigília (Willie *et al*., 2003). Enquanto alguns estudos sugerem que os receptores OX2R desempenham um papel menor na busca por drogas (Smith *et al*., 2009; Shoblock *et al*., 2011), o papel dos receptores OX2R no reforço do etanol e no comportamento de busca por etanol é menos claro. Para determinar o papel dos receptores OX2R no comportamento de consumo e busca de etanol, ratos adultos foram treinados para auto-administrar etanol (10% p/v) ou sacarose (0,7-1% p/v), a administração do antagonista seletivo do receptor de OX2R reduziu a autoadministração de etanol (Brown *et al*., 2013). Nossos resultados podem sugerir que o sistema da orexina pode desempenhar papéis diferentes entre adolescentes e adultos, já que a resposta a recompensas naturais foi determinante somente em animais adolescentes. Desta forma, temos como hipótese que o antagonismo dos receptores de orexina pode representar um potente mecanismo de redução do uso de etanol em adolescentes e, desta forma, pode representar um alvo terapêutico potencial para o tratamento de distúrbios do uso de álcool nesta idade.

4.6. **Busca pela novidade e ansiedade possuem pouco ou nenhuma importância no consumo das drogas em nosso modelo**

A busca por novidade (ou busca de sensação) é um traço de personalidade definido como uma tendência a buscar sensações e experiências emocionais novas e intensas (Zuckerman,

1979). Conforme definido por Zuckerman e colaboradores, a busca por sensação é uma "característica definida pela busca de novas sensações e a disposição de assumir riscos físicos, sociais, legais e financeiros em prol de tais experiências" (Zuckerman *et al.*, 1993). A busca por novidade é um construto comportamental multifacetado que inclui busca por emoção, preferência por novidades, assunção de riscos e prevenção de danos, e essas características de personalidade estão presentes em indivíduos com risco de desenvolver um transtorno por uso de drogas (Jupp e Dailey, 2014).

A novidade serve como um sinal que fornece motivação para buscar recompensas. Indivíduos que buscam novas experiências exibem uma força motivacional avassaladora que leva a uma menor capacidade de controlar suas ações, como no uso compulsivo de drogas. Indivíduos caracterizados com alta busca de sensações geralmente têm alta impulsividade, excitabilidade exploratória, extravagância e desordem (Zuckerman e Neeb, 1979; Cloninger, 1987; Hiroi e Agatsuma, 2005). Pessoas com alta busca por novidades costumam exibir comportamentos elevados em busca de experiências, suscetibilidade ao tédio e maiores taxas de transtorno bipolar (Zuckerman e Neeb, 1979; Zuckerman *et al.*, 1993; Howard *et al.*, 1997).

Um paralelo entre a característica de busca de sensações em humanos é o comportamento de busca de novidades entre os animais. Em roedores, a busca por novidades foi definida como uma preferência por novos objetos ou ambientes; roedores com alta procura de novidade exibem um comportamento exploratório aprimorado em relação a situações, objetos ou estímulos novos (Piazza *et al.*, 1989). Em ratos e camundongos, a preferência pela novidade foi correlacionada com maior sensibilidade aos efeitos reforçadores de muitas drogas de abuso, incluindo anfetamina, cocaína, nicotina e álcool (Piazza *et al.*, 1989; Hooks *et al.*, 1991; Ambrosio *et al.*, 1995; Suto *et al.*, 2001; Nadal *et al.*, 2002; Belin e Deroche-Gamonet, 2012; Manzo *et al.*, 2014). Medir o comportamento de busca de novidades em modelos de roedores que imitam distúrbios psiquiátricos humanos, incluindo dependência, ajudará a elucidar os detalhes neurocomportamentais destas condições psicopatológicas.

A conexão entre o comportamento de busca de novidades e a dependência de drogas tem sido amplamente estudada em cepas de ratos *outbred* e *inbred*, usando várias drogas de abuso. Diferenças individuais na vulnerabilidade ao vício foram investigadas em estudos com animais iniciados há mais de 20 anos. Até o momento, poucos estudos avaliaram comportamentos em camundongos separados em subpopulações com base em diferenças na resposta à nicotina ou etanol após avaliação comportamental. Ao investigar essa lacuna com o presente trabalho, observamos que os níveis de busca pela novidade não serviram como fenótipo preditor do consumo de etanol ou de nicotina em ambas as cepas em qualquer idade.

A relação entre a procura de novidades e a ingestão de álcool em ratos é ambígua. A procura de novidades é medida em roedores como aumento da locomoção em um novo ambiente, tipicamente câmaras de atividade ou campo aberto. Em ratos *outbred*, existem trabalhos prévios com relação positiva (Karatayev *et al.*, 2010) ou negativa (Gingras e Cools, 1995) ou nenhuma relação (Bisaga e Kostowski, 1993; Fahlke *et al.*, 1995; Koros *et al.*, 1998) entre atividade induzida por novidade e ingestão de álcool. Inconsistências semelhantes foram observadas em ratos selecionados para alto e baixo consumo de álcool. Ratos que preferem álcool exibem maior atividade locomotora que os que não preferem (Badishtov et al., 1995); no entanto, ratos que preferem álcool apresentam menos (Fahlke *et al.*, 1993) ou os mesmos níveis de atividade locomotora induzida por novidade (Badishtov *et al*., 1995) do que as linhas não-preferenciais de álcool. Nem a atividade locomotora induzida pela novidade nem a aprendizagem reversa / discriminação previram o consumo de álcool em sessões de acesso limitado ou contínuo. Embora a alta reatividade à novidade preveja a auto-administração de estimulantes (Piazza *et al.*, 1990) e opiáceos (Pelloux *et al.*, 2006) em roedores, efeitos semelhantes não foram observados com o álcool (Bisaga e Kostowski, 1993).

Contrariando os resultados encontrados nesse estudo, um trabalho anterior do nosso grupo demonstrou que a resposta à novidade conseguiu prever o consumo oral de nicotina em ratos adolescentes (Abreu-Villaça *et al.*, 2006). Neste trabalho a relação entre busca por novidade e consumo de nicotina não é intensa e apena ocorre em alguns dias após o início do teste de dupla escolha. Desta forma, o presente trabalho sugere que esta relação parece não ser consistente o suficiente para que se sustente que esse fenótipo possa ser um bom preditor para o consumo de nicotina. Outro estudo sobre várias medidas comportamentais de busca de novidades descobriu que elas não compartilhavam um conjunto comum de causalidade genética, indicando que diferentes comportamentos relacionados à novidade podem ser determinados por diferentes caminhos (Kliethermes e Crabb, 2006). Esses achados podem explicar por que *head dips* não são indicadores confiáveis da ingestão subsequente de nicotina, mesmo que ambos estejam relacionados à novidade. Mais estudos são necessários para testar a utilidade do aparato como uma ferramenta para investigar a relação entre a vulnerabilidade à dependência da nicotina e a reatividade da novidade.

A ansiedade, por outro lado, pode ser entendida como um estado emocional adaptativo decorrente de uma condição aversiva, gerando antecipação mental de possíveis adversidades e, consequentemente, surgimento de estratégias eficazes de fuga e enfrentamento, funcionando assim como mecanismo de defesa com duração e intensidade apropriadas na presença do perigo. É até certo ponto uma condição fisiológica, porém quando essas reações de defesas se tornam

exageradas, a ansiedade passa a ser considerada patológica; ou seja, essas reações se tornam desproporcionais em relação ao estímulo, afetando o estado emocional, funcional e desempenho dos indivíduos (Allen *et al.*, 1995; DSM-V; Craske e Stein, 2016).

A ansiedade relaciona-se a sintomas emocionais e fisiológicos como medo, insegurança, perda de sono, taquicardia, respiração ofegante e rigidez muscular. É apresentado ainda sintomas cognitivos como irritabilidade e insegurança, autonômicos como sudorese e diarreia, comportamentais como fobias e compulsões, e ainda manifestações emocionais que se apresentam de modo subjetivo, gerando um conjunto de alterações comportamentais e psicofisiológicas (Nutt, 1990; DSM-V; Braga *et al.*, 2010). Atualmente muitos modelos animais são utilizados para investigação dos comportamentos relacionados a ansiedade, fornecendo, assim, um entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nos transtornos de ansiedade (Gray e McNaughton, 2000; Graeff *et al.*, 1998; Hart *et al.*, 2010; Bourin, 2015). Um dos modelos mais largamente utilizados na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos é o Labirinto em Cruz Elevado, que é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. Derivou do trabalho de Montgomery (1955) e a premissa básica é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva. Posteriormente, Lister (1987) validou o modelo para camundongos.

Em nosso estudo, o nível prévio de ansiedade foi fator significante para determinar o consumo de nicotina em situações específicas e de forma não consistente, da mesma forma os níveis prévios de ansiedade não foram capazes de afetar o consumo de etanol. Na cepa Suíça, os animais adolescentes com elevados níveis de ansiedade apresentam maior consumo de nicotina quando não há estresse por restrição de líquidos, porém este só se apresenta em alguns dias de avaliação. Na cepa C57BL/6, os animais adultos com baixos níveis de ansiedade apresentam maior consumo de nicotina na dose de 10 µg/ml no modelo de restrição de líquido. De fato, tem sido reportada a existência de cepas com diferentes sensibilidades a efeitos ansiogênicos/ansiolíticos no teste do LCE (Hogg, 1996). Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que a ansiedade basal parece não prever o padrão subsequente de consumo de nicotina em camundongos naïves (Abreu-Villaça *et al.*, 2006). No entanto, a resposta ansiogênica patológica, como aquela definida pela retirada das drogas, pode ser fator crucial. Por exemplo, Manhães e colaboradores demonstraram que a ansiedade só é fator preditor do consumo de nicotina em animais adolescentes após período de retirada desta droga (Manhães *et al.*, 2008).

4.7. **Diferenças no efeito do tempo de tomada de decisão entre os adolescentes das diferentes cepas no consumo de etanol**

As medidas comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado foram avaliadas pela análise de componentes principais. Diversas pesquisas anteriores usando análise fatorial sugerem que as diferenças no comportamento no LCE podem ser descritas como três construtos, em ordem de importância explicativa: comportamento semelhante à ansiedade, atividade locomotora e avaliação de risco/tomada de decisão (Anseloni e Brandão, 1997; Boguszewski e Zagrodzka, 2002; Doremus *et al.*, 2006). Estudos sugerem que os comportamentos de avaliação de risco parecem estar relacionados à ansiedade, mas representam um padrão comportamental mais complexo que provavelmente também está relacionado à tomada de decisão e à abordagem em lidar com conflitos.

O tempo gasto no centro do labirinto é particularmente importante, pois denota a possibilidade de tomada de decisão do camundongo. O centro do labirinto proporciona ao animal a possibilidade em explorar ou não o aparato, recuar ou não para os braços fechados (Rodgers e Cole, 1994; Rodgers e Johnson, 1995; Rodgers *et al.*, 1997; Graeff e Zangrossi, 2002; McNaughton e Corr, 2004). A tomada de decisão refere-se ao processo de formação de preferências, seleção e execução de ações, bem como avaliação de resultados em escolhas relacionadas a estímulos separados, cada um prevendo resultados mensuráveis ou recompensadores ou aversivos (Ernst e Paulus, 2005). Como tal, a tomada de decisão é um aspecto importante do controle comportamental e pode representar uma dimensão neurocomportamental intimamente relacionada a outras dimensões que refletem o comportamento impulsivo e, consequentemente, o uso de drogas.

Em nosso estudo, a avaliação do comportamento de tomada de decisão pelo tempo de permanência do animal no centro do Labirinto em Cruz Elevado indicou que os animais adolescentes da cepa Suíça com menor tempo de tomada de decisão possuem maior consumo de etanol, já animais adolescentes da cepa C57BL/6 ocorre o oposto. O resultado visto com os adolescentes da cepa Suíça corrobora estudos anteriores onde a tomada de decisão prejudicada e a impulsividade foram associados à suscetibilidade ao uso abusivo de álcool (Bates e Labouvie, 1997; Dom *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 2006; Verdejo-Garcia *et al.*, 2008; de Wit, 2009; Fernie *et al.*, 2010; Goudriaan *et al.*, 2011; King *et al.*, 2011; Fernie *et al.*, 2013). Estes estudos, quando vistos em paralelo com outros onde foi demonstrado que o uso excessivo de álcool resulta em impulsividade exagerada e tomada de decisões prejudicadas (Vuchinich e Simpson,

1998; Petry, 2001; Field *et al.*, 2007; Perry e Carroll, 2008; Salgado *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; MacKillop *et al.*, 2011; Tomassini *et al.*, 2012; Voon *et al.*, 2013), sugerem uma bidirecionalidade complexa entre prejuízos no controle de impulso e na tomada de decisão com o alcoolismo.

Além disso, a tomada de decisão é uma área particularmente importante para estudo, porque muitas decisões são tomadas sob condições estressantes, como quando as circunstâncias exigem um curso rápido de ação. De fato, o processo de tomada de decisão por si só pode ser estressante, como quando uma decisão envolve alto risco e seu resultado é incerto. Assim, a relação entre estresse e tomada de decisão pode ser bidirecional, porque o estresse pode afetar a qualidade da decisão e também ser evocado pelo processo de tomada de decisão. Estudos anteriores mostraram que o LCE ativa o sistema de estresse de roedores e aumenta os níveis de corticosterona (File *et al.*, 1994).

Mais recentemente, estudos experimentais sugerem que o estresse potencialmente exacerba vieses comportamentais na tomada de decisões, induzindo escolhas mais conservadoras para aqueles que geralmente são avessos ao risco e mais arriscadas para aqueles que tendem a ser candidatos a risco (Porcelli e Delgado, 2009; Lighthall *et al.*, 2009). Assim, diferença vista entre as cepas Suíça e C57BL/6 pode ser explicada pelo fato de a cepa C57BL/6 ser resiliente (ou seja, pouco suscetível ao estresse), enquanto a cepa Suíça tem mais propensão às estratégias de resposta baseadas em hábitos e, portanto, mais responsiva às mudanças no ambiente. Assim, um repertório de comportamentos passivos seria inicialmente exibido para lidar com o estresse da novidade e, uma vez que a situação de estresse se torna familiar, um repertório de comportamentos ativos seriam exibidos para lidar com a situação. Esses fatores de risco distintos e os padrões diferenciais de comportamentos excessivos de consumo sugerem que diferentes fatores neuroanatômicos e neuroquímicos estão subjacentes às deficiências comportamentais. É possível que, estudando os dois modelos animais selecionados com base no mesmo fenótipo comportamental de preferência de etanol de escolha livre, importantes fatores predisponentes genéticos e fenotípicos para o desejo e o consumo excessivo de álcool possam ser identificados e direcionados para intervenção farmacológica ou comportamental.

4.8. **Adolescentes C57BL/6 com baixa avaliação de risco consomem mais etanol**

Alguns modelos animais de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos de medo ou defensivos, análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Como dito anteriormente, no Labirinto em Cruz Elevado são avaliados três tipos diferentes de respostas: locomoção, ansiedade e avaliação de risco (Pellow *et al.*, 1985; Rodgers e Cole, 1993). Este último é geralmente visto como uma medida de ansiedade (Lister, 1987) e refere-se a um padrão de respostas (*stretching*, *head-dipping* e retornos aos braços fechados) invariavelmente observadas em situações potencialmente perigosas (Blanchard *et al.*, 1990; Griebel *et al.*, 1995). No LCE para roedores, a medida de avaliação de risco mais proeminente é o *stretching*.

Considera-se geralmente que a avaliação de risco é um grupo de comportamentos que representa uma antecipação de um perigo potencial e facilitam a coleta de informações em situações potencialmente perigosas, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo. Foi sugerido anteriormente que a avaliação de risco está positivamente ligada à ansiedade (Lister, 1987), onde indivíduos ansiosos parecem mais frequentemente tentar antecipar tal ameaça no intuito de lidar melhor com isto, o que acaba por trazer prejuízos para os mesmos. Em uma análise fatorial do comportamento no LCE com ratos, a avaliação de risco (medida somente pela investigação nos arredores dos braços fechados) foi relacionado a fatores como ansiedade, tomada de decisão e deslocamento (Cruz *et al.*, 1994). Em uma análise fatorial semelhante em camundongos, o *stretching* estava relacionado a avaliação de risco, enquanto o *head-diping* se relacionava forte e exclusivamente ao comportamento exploratório. Além disso, o *stretching* no braço fechado, mas não o *stretching* total, foi relacionado a ansiedade (Rodgers e Johnson, 1995).

Verificou-se que o *stretching* é mais sensível aos efeitos dos ansiolíticos clássicos (ou seja, ligantes do receptor BZ) e atípicos (ou seja, ligantes do receptor 5-HT1A) do que os índices espaço-temporais tradicionais no LCE em murinos (Griegel *et al.*, 1997; Rodgers *et al.*, 1999), o que faz a inclusão de medidas etológicas como o *stretching* no labirinto em cruz elevado fornecer um perfil mais abrangente sobre os efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de um tratamento (Rey *et al.*, 2012; Rodgers *et al.*, 1999; Calatayud *et al.*, 2004). Esses estudos sugerem que os comportamentos de avaliação de risco parecem estar relacionados à ansiedade, mas representam um padrão comportamental mais complexo que provavelmente também está relacionado à tomada de decisão e à abordagem em lidar com conflitos. A avaliação de risco parece ser um comportamento complexo que constitui uma parte crucial da maneira do animal de lidar com situações desafiadoras.

Em nosso estudo, os fenótipos da linhagem *inbred* diferiram significativamente dos camundongos Suíços no Labirinto em Cruz Elevado, especificamente, os animais C57BL/6 adolescentes que apresentam baixo nível de avaliação de risco tendem a apresentar maior consumo de etanol quando não há estresse de privação de líquidos. Observações anteriores (Rodgers *et al.*, 2002) consideram que esse perfil de baixa avaliação de risco reflete um nível basal mais baixo de ansiedade em camundongos C57BL/6. De fato, o surgimento de uma resposta relacionada à ansiedade semelhante a um adulto em ratos foi relatado apenas com o início da puberdade (Primus e Kellogg, 1989). Um grau diferencial de maturação funcional dos substratos neurais subjacentes ao comportamento relacionado à ansiedade pode, portanto, explicar esse perfil (Kellogg *et al.*, 1998).

A resposta comportamental no teste do LCE durante a adolescência difere da típica aos animais adultos, na medida em que os camundongos adolescentes expressam um aumento na motivação para a exploração, juntamente com uma redução na prevenção de riscos (Laviola *et al.*, 2003; Macrì *et al.*, 2002). Parece que os camundongos adolescentes foram realmente capazes de perceber e sondar riscos potencialmente associados aos braços abertos, no entanto, demonstraram uma motivação considerável para a exploração dos braços abertos e desprotegidos do labirinto e, portanto, estavam propensos a correr riscos para esse objetivo. Em outras palavras, os camundongos adolescentes podem estar igualmente ansiosos e perceber o mesmo nível de medo que os outros grupos etários, mas na verdade se importam menos com isso.

Os comportamentos de risco e impulsivos em excesso estão ligados a muitos distúrbios neuropsiquiátricos, como a dependência de drogas (Bechara, 2003; de Wit, 2009). Um grande número de estudos corrobora que a impulsividade e a assunção de riscos estão associadas a uma ampla gama de comportamentos problemáticos, como uso e abuso de substâncias de risco (Moeller e Dougherty, 2001; Lejuez *et al.*, 2003; Bornovalova *et al.*, 2005; Perry e Carroll, 2008; Verdejo-García *et al.*, 2008; de Wit, 2009; Dick *et al.*, 2010; MacKillop *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2014). Além disso, a gravidade do vício em drogas está positivamente correlacionada com o grau de impulsividade (Dom *et al.*, 2006; Heyman e Gibb, 2006). Uma hipótese emergente é que o vício resulta da interação de mecanismos de recompensa e inibição prejudicada (Finn, 2002; Goldstein e Volkow, 2002; Olmstead, 2006; Perry e Carroll, 2008; de Wit e Richards, 2004). Além disso, pode-se razoavelmente supor que uma parte significativa da atividade do animal durante a descoberta inicial do aparelho não é motivada por "curiosidade", mas pela busca de um meio de escapar do labirinto. Essa hipótese foi previamente apresentada para interpretar o comportamento de um animal durante a exposição

inicial a um campo aberto (Boissier e Simon, 1969; Denenberg, 1969; Misslin *et al.*, 1976; Roy e Chapillon, 2004); também está de acordo com a alta secreção de corticosterona observada em resposta a uma sessão do Labirinto em Cruz Elevada (Rodgers *et al.*, 1999).

A resposta da corticosterona foi correlacionada positivamente com medidas de comportamentos de avaliação de risco, mas não com medidas de braços abertos ou atividade locomotora geral (Albrechet-Souza *et al.*, 2007; Mikics *et al.*, 2005; Rodgers *et al.*, 1999). Então, a principal associação comportamental com a resposta da corticosterona ao LCE parecem ser tentativas abortadas de entrar nos braços abertos, em vez da exploração real dessas áreas potencialmente ameaçadoras (Rodgers *et al*., 1999). Uma vez que os comportamentos de avaliação de risco são normalmente realizados durante a sessão experimental e a resposta ao esteróide ocorre cerca de vinte minutos após o final do teste, parece que quanto maior o nível de comportamentos de avaliação de risco, maior a resposta glicocorticóide. Assim, essa ativação hormonal parece basear-se não na exploração real do ambiente estressante (Pellow *et al.*, 1985), mas na detecção do perigo. Do mesmo modo, em humanos, a antecipação de eventos ameaçadores produz uma elevação tão acentuada no cortisol quanto o próprio evento (Mason, 1968).

A esse respeito, os efeitos rápidos dos glicocorticóides podem desempenhar um papel na determinação dos estilos de enfrentamento (Koolhaas *et al.*, 1999). O comportamento no LCE se correlaciona bem com os estilos de enfrentamento (Ducottet e Belzung, 2004). Estudos demonstram que os camundongos C57BL/6 possuem fenótipo menos emocional e menos sensível ao estresse comparados com outras cepas murinas (Griebel *et al.*, 2000; Rodgers *et al.*, 2002; Van Gaalen e Steckler, 2000). Uma vez que o estresse ativa respostas emocionais em camundongos C57BL/6, o aumento das características emocionais da tarefa (por exemplo, condicionamento do medo) revelará um comportamento de *coping* mais ativo e respostas claras ligadas a estímulos nessa cepa de camundongo.

Além disso, em vista das crescentes evidências de estudos em animais e humanos sobre o envolvimento de glicocorticóides na função cognitiva (De Quervain *et al.*, 1998; Roozendaal *et al.*, 1996), é válido investigar sobre o possível envolvimento do corticosterona no aprendizado emocional que é característico do paradigma da LCE e sua relação com o estabelecimento do consumo de etanol (Holmes e Rodgers, 1998).

4.9. **Somente comportamento de "*coping* ativo" foi relevante em adultos no consumo de etanol e somente na cepa *inbred***

Humanos e animais adotam respostas apropriadas ao medo quando expostos a situações ameaçadoras (LeDoux, 2000; Blanchard *et al.*, 2001). A capacidade de lidar eficientemente com potenciais perigos influencia fortemente as consequências de estímulos aversivos nos organismos (Hartley e Phelps, 2010). Estudos em humanos e animais revelaram diferenças individuais na maneira de dominar desafios ambientais iminentes (Blanchard *et al.*, 2001; Lázaro-Muñoz *et al.*, 2010; Schlund *et al.*, 2010). Embora estudos anteriores tenham enfatizado diferenças individuais na suscetibilidade e resiliência ao desenvolvimento de comportamentos patológicos sob estresse crônico (por exemplo, comportamentos semelhantes à depressão) (Russo *et al.*, 2012), menos estudos examinam como animais individuais se adaptam e respondem a estressores agudos. Os padrões alternativos de resposta que ocorrem em reação a um ambiente desafiador são frequentemente descritos como estilo de enfrentamento (ou *coping*) e depende de muitos fatores, incluindo genótipo, desenvolvimento, experiência inicial e suporte social. O enfrentamento pode ser dividido em duas categorias amplas, ativa ou passiva, de estratégias comportamentais baseadas na presença ou ausência de tentativas de agir sobre o estressor (Southwick *et al.*, 2005; Koolhaas *et al.*, 2010).

A resposta predominante aos estímulos aversivos de animais de *coping* passivo é a imobilidade, enquanto os animais de enfrentamento ativo tendem a adotar comportamentos com o objetivo de remover a fonte de perigo (De Boer e Koolhaas, 2003; Cain e LeDoux, 2007). Essas diferentes estratégias comportamentais dependem de mecanismos fisiológicos distintos (Koolhaas *et al.*, 2010). Em ambientes naturais, estratégias “ativas” ou “passivas” representam as respostas mais eficazes para evitar perigos em potencial (Blanchard *et al.*, 2011). A adoção de tais estilos de enfrentamento depende da natureza da ameaça, mas eles também são amplamente favorecidos pela propensão individual às respostas ativas ou passivas do medo (Koolhaas *et al.*, 2010). Os comportamentos de escalar e permanecer imóvel observados no teste do nado forçado representam, respectivamente, um estilo ativo ou passivo de lidar com a situação estressante. Um comportamento ativo como escalar pode levar ao escape da situação aversiva, enquanto um comportamento passivo como a imobilidade permite preservar energia que pode ser utilizada quando e se aparecer uma chance de escapar (Cryan *et al.*, 2005).

As diferentes estratégias são caracterizadas por padrões distintos de alterações fisiológicas e neuroendócrinas, mas pouco é conhecido atualmente sobre os mecanismos

biológicos que controlam as estratégias de enfrentamento. Sugere-se que o enfrentamento ativo esteja associado à alta reatividade simpática aos estressores, enquanto o estilo passivo geralmente está associado à maior reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Koolhaas, 2008). Em nosso estudo, animais adultos C57BL/6 que apresentam maior tempo de escalada possuem maior consumo de etanol quando não há estresse por privação de líquidos. Neste sentido, a investigação da susceptibilidade a resposta alta reatividade simpática aos estressores pode ser fator relevante para o estabelecimento do consumo de etanol.

CONCLUSÃO

A influência de fatores genéticos sobre o comportamento de roedores chama a atenção para a importância do *background* genético nas diferentes linhagens utilizadas e como essa diferença poderia influenciar na análise dos resultados encontrados nos diferentes estudos. Porém, de nosso conhecimento, existem poucos trabalhos que comparem animais da linhagem Suíça com linhagens isogênicas.

Nossos dados apontam diferenças marcantes entre adolescentes e adultos das cepas estudadas. Adultos apresentaram maior consumo de etanol em todas as cepas e condições de teste, o mesmo não foi observado para o consumo de nicotina, onde os animais adultos da cepa *inbred* e os animais adolescentes da cepa Suíça apresentaram alto consumo. Além disso, as linhagens apresentaram diferenças significativas em relação aos comportamentos estudados. A influência dos perfis fenotípicos estudados variou em função da idade e também da droga.

A preferência pelo consumo de sacarose prediz consumo de etanol em ambas as cepas e de nicotina na cepa Suíça durante a adolescência. Animais com grande preferência pela solução de sacarose possuem maior consumo de etanol. Considerando que o consumo de sacarose é indicativo do comportamento motivacional em função de uma recompensa natural, este resultado indica que existe em adolescentes uma relação entre a susceptibilidade a recompensas naturais e uso de drogas. Estudos anteriores já demonstraram que a exposição a nicotina e ao etanol altera a resposta a recompensas, no entanto esta é a primeiro trabalho que indica que variações na resposta das vias límbicas a recompensa natural pode ser um fator preditivo somente durante a adolescência.

O grau de sociabilidade também é relevante ao consumo de nicotina, porém só para a cepa Suíça. Durante a adolescência, animais com baixo grau de sociabilidade apresentaram maior preferência para o consumo de nicotina, sugerindo que a preferência por maior contato social está associada ao consumo de drogas em adolescentes. Interessantemente, em adultos a influência da sociabilidade foi oposta em relação ao consumo de etanol, onde animais considerados de baixa sociabilidade apresentaram maior consumo. Desta forma, o papel do comportamento social no consumo de drogas parece ser dependente da fase da vida em que o indivíduo está exposto.

A cepa C57BL/6 possui maior resiliência, ou seja, um fenótipo menos emocional e menos sensível ao estresse, manifestando um comportamento de *coping* mais ativo frente situações de estresse e condicionadas ao medo. Esse perfil, visto em ambas as idades, parece

explicar as diferenças entre as cepas nos comportamentos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado e no teste do nado forçado. Entretanto, esse é o primeiro trabalho a indicar que a resiliência vista na cepa não protege os indivíduos da susceptibilidade ao consumo de nicotina e de etanol.

De forma geral, os resultados do presente estudo indicam que o perfil fenotípico comportamental em adolescentes está associado ao consumo de drogas. Além disso, os dados indicam que entre os comportamentos típicos da adolescência avaliados aqui (menor ansiedade, menor sociabilidade e maior resposta a recompensas naturais), a resposta a recompensas naturais e o comportamento social parecem ser os mais relevantes no estabelecimento do perfil de consumo de nicotina e etanol.

REFERÊNCIAS

ABRAHAO, K.P.; QUADROS, I.M.; SOUZA-FORMIGONI, M.L. Morphine attenuates the expression of sensitization to ethanol, but opioid antagonists do not. Neuroscience, v. 156, p. 857-864, 2008

ABREU-VILLAÇA, Y.; QUEIROZ-GOMES, F. DO E.; DAL MONTE, A.P.; FILGUEIRAS, C.C.; MANHÃES, A.C. Individual differences in novelty-seeking behavior but not inanxiety response to a new environment can predict nicotine consumptionin adolescent C57BL/6 mice. Behav Brain Res 2006;167(February (1)):175–82.

ABREU-VILLAÇA, Y.; CAVINA, C.C.; RIBEIRO-CARVALHO, A.; CORREA-SANTOS, M.; NAIFF, V.F.; FILGUEIRAS, C.C.; MANHÃES, A.C. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol during adolescence leads to short- and long-term modulation of anxiety-like behavior. Drug Alcohol Depend. 2013b Nov 1;133(1):52-60.

ABREU-VILLAÇA, Y.; DE CARVALHO GRAÇA, A.C, RIBEIRO-CARVALHO, A.; NAIFF, V. DE F.; MANHÃES, A.C.; FILGUEIRAS, C.C. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. Nicotine Tob Res. 2013a Jul;15(7):1211-21.

ABREU-VILLAÇA, Y.; FILGUEIRAS, C.C.; CORREA-SANTOS, M.; CAVINA, C.C.; NAIFF, V.F.; KRAHE, T.E.; MANHÃES, A.C.; RIBEIRO-CARVALHO, A. Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. Psychopharmacology (Berl). 2015 May;232(10):1693-703.

ABREU-VILLAÇA, Y.; FILGUEIRAS, C.C.; GUTHIERREZ, M.; MEDEIROS, A.H.; MATTOS, M.A.; PEREIRA, M. DOS S.; MANHÃES, A.C.; KUBRUSLY, R. C. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. Nicotine Tob Res. 2010; 12:776-80.

ABREU-VILLAÇA, Y.; MANHÃES, A.C.; KRAHE, T.E.; FILGUEIRAS, C.C.; RIBEIRO-CARVALHO, A. Tobacco and alcohol use during adolescence: Interactive mechanisms in animal models. Biochem Pharmacol. 2017 Jun 7. pii: S0006-2952(17)30436-7.

ABREU-VILLAÇA, Y.; NUNES, F. DO E.; QUEIROZ-GOMES. F.; MANHÃES, A.C.; FILGUEIRAS, C.C. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. Neuropsychopharmacology. 2008. Feb;33(3):599-610.

ABREU-VILLAÇA, Y.; QUEIROZ-GOMES, F. DO E.; DAL MONTE, A.P.; FILGUEIRAS, C.C.; MANHÃES, A.C. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. Behav Brain Res. 2006 Feb 15;167(1):175-82.

ABREU-VILLAÇA, Y.; SEIDLER, F.J.; QIAO, D.; TATE, C.A.; COUSINS, M.M.; THILAI, I.; SLOTKIN, T.A. Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. Neuropsychopharmacology, 2003; 28:1935-49.

ADRIANI, W.; MACRI, S.; PACIFICI, R.; LAVIOLA, G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. Neuropsychopharmacology, 2002; 27:212-224.

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

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. Neuropharmacology, 2000; 39:334-46.

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice. Behavioral Neuroscience, 2003; 117: 695-703.

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. Behavioural Pharmacology, 2004; 15: 341-52.

AHMED, S.H.; KOOB, G.F. Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. Psychopharmacology (Berl). 1999 Oct;146(3):303-12.

AHMED, S.H.; KOOB, G.F. Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. Science. 1998 Oct 9;282(5387):298-300.

AHMED, S.H.; WALKER, J.R.; KOOB, G.F. Persistent increase in the motivation to take heroin in rats with a history of drug escalation. Neuropsychopharmacology. 2000 Apr;22(4):413-21

ALAUX-CANTIN, S.; WARNAULT, V.; LEGASTELOIS, R.; BOTIA, B.; PIERREFICHE, O.; VILPOUX, C.; NAASSILA, M. Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. 2013. Neuropharmacology, 67, 521e531.

ALBRECHET-SOUZA, L.; CARVALHO, M.C.; FRANCI, C.R.; BRANDÃO, M.L. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. Hormones and Behavior 2007 52, 267-273.

ALLEN, A.J.; LEONARD, H; SWEDO, S.E. Current knowledge of medications for the treatment of childhood anxiety disorders. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, [S.I.], v. 34, p. 976-86, 1995.

AMBROSIO, E.; GOLDBERG, S.R.; ELMER, G.I. Behavior genetic investigation of the relationship between spontaneous locomotor activity and the acquisition of morphine self-administration behavior. Behav Pharmacol. 1995; 6:229–237.

AMERICAN LUNG ASSOCIATION. Trends in tobacco use. Epidemiology and Statistics Unit. New York: American Lung Association; 2002; 1-32.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5 ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.

ANDERSEN, S.L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2003; 27: 3-18.

ANSELONI, V.Z.; BRANDAO, M.L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. Behav Pharmacol 1997 8:533–540.

ARNETT, J.J. Adolescent storm and stress, reconsidered. The American Psychologist, 1999; 54: 317-326.

ASTON-JONES, G.; SMITH, R.J.; SARTOR, G.C.; MOORMAN, D.E.; MASSI, L.; TAHSILI-FAHADAN, P.; RICHARDSON, K.A. Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. Brain Res. 2010;1314:74–90.

BACHMAN, J.G.; WADSWORTH, K.N.; O'MALLEY, P.M.; JOHNSTON, L.D.; SCHULENBERG, J.E. Smoking, drinking, and drug use in young adulthood: The impacts of new freedoms and new responsibilities. 1997. Mahwah, N.J: L. Erlbaum Associates.

BADISHTOV, B.; OVERSTREET, D.; KASHEVSKAYA, O.; VIGLINSKAYA, I.; KAMPOV-POLEVOY, A.; SEREDENIN, S.; HALIKAS, J. To drink or not to drink: open field behavior in alcohol-preferring and non preferring rat strains. Physiol Behav 1995 57:585–589.

BAER, P.E.; GARMEZY, L.B.; MCLAUGHLIN, R.J.; POKOMY, A.D.; WEMICK, M.J. Stress, coping, family conflict, and adolescent alcohol use. Journal of Behavioral Medicine 1987; 10: 449-66.

BAHI, A.; DREYER, J.L. Involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in ethanol drinking, ethanol-induced conditioned place preference, and ethanol-induced psychomotor sensitization in mice. Psychopharmacology 2012;222:141-153.

BARRON, S.; WHITE, A.; SWARTZWELDER, H.S.; BELL, R.L.; RODD, Z.A.; SLAWECKI, C.J.; EHLERS, C.L.; LEVIN, E.D.; REZVANI, A.H.; SPEAR, L.P. Adolescent vulnerabilities to chronic alcohol or nicotine exposure: findings from rodent models. Alcoholism, Clinical and Experimental Research, 2005; 29:1720-5.

BATES, M.E.; LABOUVIE, E.W. Adolescent risk factors and the prediction of persistent alcohol and drug use into adulthood. Alcohol Clin Exp Res. 1997;21:944–950.

BAUMRIND, D.A. Developmental perspective on adolescent risk taking in contemporary America. In: IRWIN, C.E., Jr. (Eds.) Adolescent Social Behavior and Health, San Francisco, CA: Jossey-Bass, 1987, pp. 93-125.

BECHARA, A. Risky business: emotion, decision-making, and addiction. Journal of Gambling Studies. 2003;19:23–51.

BELIN, D.; DEROCHE-GAMONET, V. Responses to novelty and vulnerability to cocaine addiction: contribution of a multi-symptomatic animal model. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012:2.

BERRIDGE, K.C.; ROBINSON, T.E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward leraning, or incentive salience? Brain Res Brain Rev, v.28, p.309-369, 1998.

BERRIDGE, K.C; ROBINSON, T.E.; ALDRIDGE, J.W. Dissecting Components of reward: ‘liking’, ‘waiting’, and learning. Curr Opin Pharmacol, v.9, p.65-73, 2009.

BISAGA, A.; KOSTOWSKI, W. Individual behavioral differences and ethanolconsumption in Wistar rats. Physiol Behav 1993 54:1125–1131.

BJORK, J.M., SMITH, A.R., CHEN, G., HOMMER, D.W. Adolescents, adults and rewards: comparing motivational neurocircuitry recruitment using fMRI. PLoS One, 2010; 5(7), e11440.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; TOM, P.; RODGERS, R.J. Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. Psychopharmacology 1990 101:511–518.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. Neurosci Biobehav Rev 2001 25:205–218.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; POBBE, R.; BLANCHARD, R.J. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. Neurosci Biobehav Rev 2011 35:991–998.

BOGDANOVA, O.V.; KANEKAR, S.; D'ANCI, K.E.; RENSHAW, P.F. Factors influencing behavior in the forced swim test. Physiol Behav. 2013 Jun 13;118:227-39.

BOGUSZEWSKI, P.; ZAGRODZKA, J. Emotional changes related to age in rats — a behavioral analysis. Behav Brain Res 2002 133:323–332.

BOISSIER, J.R.; SIMON, P. Evaluation of experimental technique in the psychopharmacology of emotion. Annals of the New York Academy of Sciences 1969 159, 898 - 914.

BONASSOLI, V.T; MILANI, H.; DE OLIVEIRA, R.M.W. Ethanol withdrawal activates nitric oxide-producing neurons in anxiety-related brain areas. Alcohol, vol. 45, 2011, p. 641-652.

BORGLAND, S.L.; TAHA, S.A.; SARTI, F.; FIELDS, H.L.; BONCI, A. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. Neuron 2006 49: 589–601.

BORNOVALOVA, M.A.; DAUGHTERS, S.B.; HERNANDEZ, G.D.; RICHARDS, J.B.; LEJUEZ, C.W. Differences in impulsivity and risk-taking propensity between primary users of crack cocaine and primary users of heroin in a residential substance-use program. Exp. Clin. Psychopharmacol. 2005 13, 311–318.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. Dialogues in Clinical Neuroscience, v. 17. n. 3, p. 296-303, 2015.

BOUTREL, B.; KOOB, G.F. What keeps us awake: the neuropharmacology of stimulants and wakefulness-promoting medications. Sleep 2004, 27:1181-1194.

BOWEN, M.T.; CARSON, D.S.; SPIRO, A.; ARNOLD, J.C.; MCGREGOR, I.S. Adolescent oxytocin exposure causes persistent reductions in anxiety and alcohol consumption and enhances sociability in rats. PLoS One. 2011;6(11):e27237

BRAGA, J.E.F.; PORDEUS, L.C.; SILVA, A.T.M.C.; PIMENTA, F.C.F.E.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica - Pathological Anxiety: Neural Bases and Advances in Psychopharmacological. Revista Brasileira de Ciências da Saúde. v. 14, n. 2, p. 93-100, 2010.

BRIELMAIER, J.M.; MCDONALD, C.G.; SMITH, R.F. Immediate and long-term behavioral effects of a single nicotine injection in adolescent and adult rats. Neurotoxicology and Teratology, 2007; 29: 74-80.

BRIONI, J.D.; O'NEILL, A.B.; KIM, D.J.; DECKER, M.W. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. European Journal of Pharmacology, 1993; 238: 108.

BROOK, J.S.; RICHTER, L.; RUBENSTONE, E. Consequences of adolescent drug use on psychiatric disorders in early adulthood. Ann Med, 2000; 32(6), 401-407.

BROOK, J.S.; WHITEMAN, M.; GORDON, A.S.; COHEN, P. Dynamics of childhood and adolescent personality traits and drug use. Developmental Psychology 1986;22:403–414.

BROOKS, S.P.; PASK, T.; JONES, L.; DUNNETT, S.B. Behavioral profiles of inbred mouse strains used as transgenic background. I: motor tests. Gene Brain Behav. 3, 206–215. 2004.

BROOKS, S.P.; PASK, T.; JONES, L.; DUNNETT, S.B. Behavioral profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. II: cognitive tests. Gene Brain Behav. 4, 307–317. 2005.

BROWN, A.S. Recovery patterns in adolescents substance abuse. In: BAER JS, MARLAT GA, MACMAHON RJ, editors. Addictive behaviors across the life span: prevention, treatment, and policy issues, Newbury Park, CA: Sage Publications, 1993.p.161-83.

BROWN, R.M.; KHOO, S.Y.S.; LAWRENCE, A.J. Central orexin (hypocretin) 2 receptor antagonism reduces etanol self-administration, but not cue-conditioned ethanol-seeking, in ethanol-preferring (iP) rats. Int J Neuropsychopharmacol 2013 16: 2067–2079.

BRUNELL, S.C.; SPEAR, L.P. Effect of stress on the voluntary intake of a sweetened ethanol solution in pair-housed adolescent and adult rats. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2005, 29, 1641e1653.

CABRAL, A.; ISOARDI, N.; SALUM, C.; MACEDO, C.E.; NOBRE, M.J.; MOLINA, V.A.; BRANDÃO, M.L. Fear state induced by ethanol withdrawal may be due to the sensitization of the neural substrates of aversion in the dPAG. Experim Neurol, vol. 200, 2006, p. 200-208.

CAIN, C.K.; LEDOUX, J.E. Escape from fear: A detailed behavioral analysis of two atypical responses reinforced by CS termination. J Exp Psychol Anim Behav Process 2007 33:451– 463.

CALATAYUD, F.; BELZUNG, C.; AUBERT, A. Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches. Behav. Processes 2004 67, 195–206.

CANNON, C.M.; BSEIKRI, R. Is dopamine required for natural reward? Claire, M; Mustafa, R. Psychopharmacology and Behavioral, v. 81, p. 741-48, 2004.

CARLINI, E.; NOTO, A.R.; SANCHEZ, Z.; CARLINI, C.; LOCATELLI, D.; ABEID, L.; ... MOURA, Y.G. VI levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras. 2012. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas - CEBRID.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. Neurosci Biobehav Rev. 2005;29(8):1193-205.

CASEY, B.J.; TOTTENHAM, N.; LISTON, C.; DURSTON, S. Imaging the developing brain: what have we learned about cognitive development? Trends Cogn Sci. 2005 Mar;9(3):104-10.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, M.W. National Health interview survey (NHIS). HYATTSVILLE, MD: National Center for Health Statistics; 1998.

CHASSIN, L.; PILLOW, D.R.; CURRAN, P.J.; MOLINA, B.S.G.; BARRERA, M. JR. Relation of parental alcoholism to early adolescent substance use: A test of three mediating mechanisms. Journal of Abnormal Psychology 1993;102:3–19.

CHEETA, S., IRVINE, E.E., TUCCI, S., SANDHU, J., FILE, S.E. In adolescence, female rats are more sensitive to the anxiolytic effect of nicotine than are male rats. Neuropsychopharmacology, 2001; 25: 601-607.

CHEN, J.; MILLAR, W.J. Age of smoking initiation: implications for quitting. Health Reports, 1998; 9:39-46.

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. 1995 Jan;85(1):41-7.

CLONINGER, C.R. Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. Science. 1987; 236:410–416.

COLOMBO, G.; ADDOLORATO, G.; AGABIO, R.; CARAI, M.A.M.; PIBIRI, F.; SERRA, S.; VACCA, G.; GESSA L.G. Role of GABAB receptor in alcohol dependence: reducing effect of baclofen on alcohol intake and alcohol motivational properties in rats and amelioration of

alcohol withdrawal syndrome and alcohol craving in human alcoholics. Neurotoxicity Research, Vol. 6, nº 5, 2004, p.403-414.

COSTA, A.P.; VIEIRA, C.; BOHNER, L.O.; SILVA, C.F.; SANTOS, E.C.; DE LIMA, T.C.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatr. 45, 150–155. 2013.

CRASKE, M.G.; STEIN, M.B. Anxiety. Lancet, v. 388, p. 3048–59, 2016.

CRUZ, A.P.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav. 1994 Sep;49(1):171-6.

CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 2005 29(4-5), 547-569.

CULLEN, K.A.; AMBROSE, B.K.; GENTZKE, A.S.; APELBERG, B.J.; JAMAL, A.; KING, B.A. Notes from the Field: Use of Electronic Cigarettes and Any Tobacco Product Among Middle and High School Students - United States, 2011-2018. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018 Nov 16;67(45):1276-1277.

CUNNINGHAM, C.L.; FIDLER, T.L.; HILL, K.G. Animal Models of Alcohol's Motivational Effects. Alcohol Research & Health. Vol. 24, nº. 2, 2000.

DAHL, R.E. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Ann N Y Acad Sci. 2004. Jun;1021:1-22.

DAHL, R.E.; SPEAR, L.P. Adolescent brain development: Vulnerabilities and opportunities. 2004. New York, N.Y: The New York Academy of Sciences.

DAYAS, C.V.; MCGRANAHAN, T.M.; MARTIN-FARDON, R.; WEISS, F. Stimuli linked to ethanol availability activate hypothalamic CART and orexin neurons in a reinstatement model of relapse. Biol Psychiatry 2008 63: 152–157.

DE BOER, S.F., KOOLHAAS, J.M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. Eur J Pharmacol 2003 463:145–161.

DE LECEA, L.; KILDUFF, T.S.; PEYRON, C.; GAO, X.; FOYE, P.E.; DANIELSON, P.E.; FUKUHARA, C.; BATTENBERG, E.L.; GAUTVIK, V.T.; BARTLETT, F.S., 2ND; FRANKEL, W.N.; VAN DEN POL, A.N.; BLOOM, F.E.; GAUTVIK, K.M.; SUTCLIFFE, J.G. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:322–7.

DE QUERVAIN, D.J.F.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. Nature 1998 394, 787-790.

DE WIT, D.J.; ADLAF, E.M.; OFFORD, D.R.; OGBORNE, A.C. Age at first alcohol use: A risk factor for the development of alcohol disorders. The American Journal of Psychiatry, 2000, 157, 745e750.

DE WIT, D.J.; MACDONALD, K.; OFFORD, D.R. Childhood stress and symptoms of drug dependence in adolescence and early adulthood: social phobia as a mediator. American Journal of Orthopsychiatry,1999; 69:61-72.

DE WIT, H. Impulsivity as a determinant and consequence of drug use: A review of underlying processes. Addiction Biology. 2009;14:22–31.

DE WIT, H.; RICHARDS, J.B. Dual Determinants of Drug Use in Humans: Reward and Impulsivity in Motivational Factors in the Etiology of Drug Abuse. University of Nebraska Press; Lincoln, NE: 2004.

DENENBERG, V.H. Open-field behavior in the rat: What does it mean? Annals of the New York Academy of Sciences 1969 159, 852–859.

DEYKIN, E.Y.; LEVY, J.C.; WELL, V. Adolescent depression, alcohol and drug abuse. American Journal of Public Health, 1987; 77:178-82.

DI CHIARA, G. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. European Journal of Pharmacology. 2000; 393:295-314.

DI FRANZA, J.R.; RIGOTTI, N.A.; MCNEILL, A.D.; OCKENE, J.K.; SAVAGEAU, J.A.; ST. CYR, D.; COLEMAN, M. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. Tobacco Control 9: 313-319. 2000.

DI FRANZA, J.R.; SAVAGEAU, J.A.; FLETCHER, K.; OCKENE, J.K.; RIGOTTI, N.A.; MCNEILL, A.D.; COLEMAN, M.; WOOD. C. 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. 156: 397-403. 2002a.

DI FRANZA, J.R.; SAVAGEAU, J.A.; RIGOTTI, N.A.; FLETCHER, K.; OCKENE, J.K.; MCNEILL, A.D.; COLEMAN, M.; WOOD, C. Development of symptoms of tobacco dependence in youths: 30-month follow-up data from the DANDY study. Tobacco Control 11: 228-235. 2002b.

DICK, D.M.; SMITH, G.; OLAUSSON, P.; MITCHELL, S.H.; LEEMAN, R.F.; O'MALLEY, S.S.; SHER, K. Understanding the construct of impulsivity and its relationship to alcohol use disorders. Addict. Biol. 2010 15, 217–226.

DOM, G.; D'HAENE, P.; HULSTIJN, W.; SABBE, B. Impulsivity in abstinent early- and late-onset alcoholics: differences in self-report measures and a discounting task. Addiction. 2006;101:50–59.

DOREMUS, T.L.; BRUNELL, S.C.; RAJENDRAN, P.; SPEAR, L.P. Factors influencing elevated ethanol consumption in adolescent relative to adult rats. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2005, 29, 1796e1808.

DOREMUS, T.L.; BRUNELL, S.C.; VARLINSKAYA, E.I.; SPEAR, L.P. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavioral, 2003; 75: 411-418.

DOREMUS, T.L.; VARLINSKAYA, E.I.; SPEAR, L.P. Factor analysis of elevated plus-maze behavior in adolescent and adult rats. Pharmacol Biochem Behav 2006 83:570–577.

DUCOTTET, C., BELZUNG, C. Behavior in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. Physiol. Behav. 2004 81,417–426.

DUTRA-TAVARES, A.C.; MANHÃES, A.C.; SILVA, J.O.; NUNES-FREITAS, A.L.; CONCEIÇÃO, E.P.; MOURA, E.G.; LISBOA, P.C.; FILGUEIRAS, C.C.; ABREU-VILLAÇA, Y.; RIBEIRO-CARVALHO, A. Locomotor response to acute nicotine in adolescent mice is altered by maternal undernutrition during lactation. Int J Dev Neurosci. 2015 Dec;47(Pt B):278-85.

EHLERS, C.L., GIZER, I.R.; VIETEN, C.; GILDER, A.; GILDER, D.A.; STOUFFER, G.M.; LAU, P.; WILHELMSEN, K.C. Age at regular drinking, clinical course, and heritability of alcohol dependence in the San Francisco family study: A gender analysis. The American Journal on Addictions, 2010, 19, 101e110.

EHLERS, C.L.; SLUTSKE, W.S.; GILDER, D.A.; LAU, P.; WILHELMSEN, K.C. Age at first intoxication and alcohol use disorders in Southwest California Indians. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2006, 30, 1856e1865.

EISSENBERG, T.; BALSTER, R. Initial tobacco use episodes in children and adolescents: current knowledge, future directions. Drug Alcohol Depend, 2000 41–60.

ELLIOTT, B.M., FARADAY, M.M., PHILLIPS, J.M., GRUNBERG, N.E. Adolescent and adult female rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. Pharmacology, Biochemistry, and Behavior, 2005; 80:567-75.

ELLIOTT, B.M.; FARADAY, M.M.; PHILLIPS, J.M.; GRUNBERG, N.E. Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. Pharmacol Biochem Behav. 2004 Jan;77(1):21-8.

ERNST, M.; LUCKENBAUGH, D.A.; MOOLCHAN, E.T.; LEFF, M.K.; ALLEN, R.; ESHEL, N.; LONDON, E.D.; KIMES, A. Behavioral predictors of substance-use initiation in adolescents with and without attention-deficit/hyperactivity disorder. Pediatrics. 2006;117:2030–2039.

ERNST, M.; PAULUS, M.P. Neurobiology of Decision Making: A Selective Reviewfrom a Neurocognitive and Clinical Perspective. Biol Psychiatry 2005;58:597–604

FABIO, M.C.; NIZHNIKOV, M.E.; SPEAR, N.E.; PAUTASSI, R.M. Binge ethanol intoxication heightens subsequent ethanol intake in adolescent, but not adult, rats. Developmental Psychobiology, 2014, 56, 574e583.

FAHLKE, C.; ERIKSSON, C.; HÅRD, E. Audiogenic immobility reaction and open-field behavior in AA and ANArat lines. Alcohol 1993 10:311–315.

FAHLKE, C.; HÅRD, E.; ERIKSSON, C.; ENGEL, J.; HANSEN, S. Amphetamine-induced hyperactivity: differences between rats with high or low preferencefor alcohol. Alcohol 1995 12:363–367.

FERNANDES, C.; FILE, S.E. THE influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav. 1996 May;54(1):31-40.

FERNIE, G.; COLE, J.C.; GOUDIE, A.J.; FIELD, M. Risk-taking but not response inhibition or delay discounting predict alcohol consumption in social drinkers. Drug Alcohol Depend. 2010;112:54–61.

FERNIE, G.; PEETERS, M.; GULLO, M.J.; CHRISTIANSEN, P.; COLE, J.C.; SUMNALL, H.; FIELD, M. Multiple behavioural impulsivity tasks predict prospective alcohol involvement in adolescents. Addiction. 2013;108:1916–1923.

FIELD, M.; CHRISTIANSEN, P.; COLE, J.; GOUDIE, A. Delay discounting and the alcohol Stroop in heavy drinking adolescents. Addiction. 2007;102:579–586.

FILE, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. Behav Brain Res. 2001 Nov 1;125(1-2):151-7.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H.; SANDERS, F.L.; MABBUTT, P.S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. Psychopharmacology (Berl). 1994;113(3-4):543–6.

FILGUEIRAS, C.C.; ABREU-VILLAÇA, Y.; KRAHE, T.E.; MANHÃES, A.C. Unilateral hemispherectomy at adulthood asymmetrically affects immobile behavior of male Swiss mice. Behav Brain Res. 2006 Sep 15;172(1):33-8.

FINKELSTEIN, D.M.; KUBZANSKY, L.D.; GOODMAN, E. Social Status, Stress, and Adolescent Smoking. Journal of Adolescent Health. 2006; 39:678–685.

FINN, P.R. Motivation, working memory, and decision making: a cognitive-motivational theory of personality vulnerability to alcoholism. Behav Cogn Neurosci Rev. 2002;1:183–205.

FLAGEL, S.B.; WASELUS, M.; CLINTON, S.M.; WATSON, S.J.; AKIL, H. Antecedents and consequences of drug abuse in rats selectively bred for high and low response to novelty. Neuropharmacology. 2014; 76(Pt B):425–436.

GALDINO, P.M.; CARVALHO, A.A.; FLORENTINO, I.F.; MARTINS, J.L.; GAZOLA, A.C.; DE PAULA, J.R.; DE PAULA, J.A.; TORRES, L.M.; COSTA, E.A.; DE LIMA, T.C. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like properties of Lafoensi pacari A. St. Hil. J. Ethnopharmacol. 170, 218–225. 2015.

GENN, R.F.; TUCCI, A.S.; THOMAS, A.; EDWARDS, J.E.; FILE, A.S. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. Neuroscience Biobehavioral Review 2003; 27:155-61.

GILBERT, D. Smoking: Individual differences, psychopathology, and emotion. Washington, DC: Taylor & Francis; 1995.

GILPIN, N.W.; KARANIKAS, C.A.; RICHARDSON, H.N. Adolescent binge drinking leads to changes in alcohol drinking, anxiety, and amygdalar corticotropin releasing factor cells in adulthood in male rats. PLoS One, 2012, 7, e31466.

GINGRAS, M.; COOLS, A. Differential ethanol intake in high and low responders to novelty. Behav Pharmacol 1995 6:718–723.

GINSBURG, B.C.; LAMB, R.J. Reinforcement of an alternative behavior as a model of recovery and relapse in the rat. Behavioural Processes, vol. 94, 2013, p. 60– 66.

GOLDSTEIN, R.Z.; VOLKOW, N.D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. Am J Psychiatry. 2002;159:1642–1652.

GOUDRIAAN, A.E.; GREKIN, E.R.; SHER, K.J. Decision making and response inhibition as predictors of heavy alcohol use: a prospective study. Alcohol Clin Exp Res. 2011;35:1050–1057.

GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, [S.I.], v. 23, p. 237–246, 1998.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Animal models of anxiety disorders. In: D'HAENEN, H.; DEN BOER, J.A.; WESTENBERG, H.; WILLNER, P. (eds.). Textbook of biological psychiatry. John Wiley & Sons, London, pp. 879-893, 2002.

GRANT, B.F. The impact of a family history of alcoholism on the relationship between age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol dependence: Results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. Alcohol Health and Research World, 1998, 22, 144e147.

GRANT, B.F.; DAWSON, D.A. Age at onset of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse and dependence: Results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. Journal of Substance Abuse, 1997, 9, 103e110.

GRANT, B.F.; DAWSON, D.A.; STINSON, F.S.; CHOU, S.P.; DUFOUR, M.C.; PICKERING, R.P. The 12-month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991e1992 and 2001e2002. Drug and Alcohol Dependence, 2004, 74, 223e234.

GRANT, B.F.; HARFORD, T.C.; GRIGSON, M.B. Stability of alcohol consumption among youth: A national longitudinal study. Journal of Studies on Alcohol, 1987; 49: 253-260

GRANT, B.F.; HASIN, D.S.; CHOU, S.P.; STINSON, F.S.; DAWSON, D.A. Nicotine dependence and psychiatric disorders in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. Arch Gen Psychiatry. 2004 Nov;61(11):1107-15.

GRAY, J.A.; McNAUGAHTON, N. The neuropsychogy of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Ed. 2 nd. Oxford University Press, London, England, 2000.

GREENLUND, K.; JOHNSON, C.; WEBBER, L.; BERENSON, G. Cigarette smoking attitudes and first use among third- through sixth-grade students: the bogalusa heart study. Am J Public Heal. 1997 87, 1345–1348.

GRIEBEL, G.; BELZUNG, C.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. Differences in anxiety-related behaviors and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. Psychopharmacology 2000; 148: 164-170.

GRIEBEL, G.; BLANCHARD, D.C.; JUNG, A.; BLANCHARD, R.J. A model of 'antipredator' defense in Swiss–Webster mice: Effects of benzodiazepine receptor ligands with different intrinsic activities. Behav. Pharmacol. 1995 6:732–745.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R.J.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. Pharmacol Biochem Behav. 1997 Aug;57(4):817-27.

HARRIS, G.C.; WIMMER, M.; ASTON-JONES, G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. Nature 2005 437 (7058): 556–559.

HARRIS, G.C.; WIMMER, M.; RANDALL-THOMPSON, J.F.; ASTON-JONES, G. Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. Behav Brain Res 2007 183: 43–51.

HART, P.C.; BERGNER, C.L.; SMOLINSKY, A.N.; DUFOUR, B.D.; EGAN, R.J.; LAPORTE, J.L.; KALUEFF, A.V. Experimental Models of Anxiety for Drug Discovery and Brain Research. Methods Mol Biol, [S.I.], v. 602, p. 299-321, 2010.

HARTLEY, C.A.; PHELPS, E.A. Changing fear: the neurocircuitry of emotion regulation. Neuropsychopharmacology 2010 35:136 –146.

HEILIG, M.; KOOB, G.F. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. Trends Neurosci, vol. 30, nº 8, 2007, p. 399–406.

HEINRICHS, M.; VON DAWANS, B.; DOMES, G. Oxytocin, vasopressin, and human social behavior. Front. Neuroendocrinol. 2009 30, 548–557.

HEYMAN, G.M.; GIBB, S.P. Delay discounting in college cigarette chippers.Behav Pharmacol 2006 17:669–679.

HICKS, B.M.; IACONO, W.G., MCGUE, M. Consequences of an adolescent onset and persistent course of alcohol dependence in men: Adolescent risk factors and adult outcomes. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2010, 34, 819e833.

HINGSON, R.W.; HEEREN, T.; EDWARDS, E.M. Age at drinking onset, alcohol dependence, and their relation to drug use and dependence, driving under the influence of drugs, and motor-vehicle crash involvement because of drugs. Journal of Studies on Alcohol and Drugs, 2008, 69, 192e201.

HIROI, N.; AGATSUMA, S. Genetic susceptibility to substance dependence. Mol Psychiatry. 2005; 10:336–344.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. Pharmacol Biochem Behav 1996 54:21–30

HOLLANDER, J.A.; LU, Q.; CAMERON, M.D.; KAMENECKA, T.M.; KENNY, P.J. Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. Proc Natl Acad Sci U S A 2008 105: 19480–19485.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze as experience: further evidence for qualitative shift in emotional state. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 1998 60, 473-488.

HOOKS, M.S.; JONES, G.H.; SMITH, A.D.; NEILL, D.B.; JUSTICE JR, J.B. Response to novelty predicts the locomotor and nucleus accumbens dopamine response to cocaine. Synapse. 1991; 9:121–128.

HOPE, B.T.; SIMMONS, D.E.; MITCHELL, T.B.; KREUTER, J.D.; MATTSON, B.J. Cocaine-induced locomotor activity and Fos expression in nucleus accumbens are sensitized for 6 months after repeated cocaine administration outside the home cage. European Journal of Neuroscience, v.24, p.867-875, 2006.

HOWARD, M.O.; KIVLAHAN, D.; WALKER, R.D. Cloninger's tridimensional theory of personality and psychopathology: applications to substance use disorders. J Stud Alcohol. 1997; 58:48–66.

IACONO, W.G.; CARLSON, S.R.; MALONE, S.M., MCGUE, M. P3 event-related potential amplitude and the risk for disinhibitory disorders in adolescent boys. Archives of General Psychiatry, 2002, 59, 750e757.

IMHOF, J.T.; COELHO, Z.M.; SCHMITT, M.L.; MORATO, G.S.; CAROBREZ, A.P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. Behavioural Brain Research 1993; 56: 177-80.

JEANBLANC, J.; BALGUERIE, K.; COUNE, F.; LEGASTELOIS, R.; JEANBLANC, V.; NAASSILA, M. Light alcohol intake during adolescence induces alcohol addiction in a neurodevelopmental model of schizophrenia. Addiction Biology, 2015, 20, 490e499.

JENTSCH, J.D.; HENRY, P.J.; MASON, P.A.; MERRITT, J.H.; ZIRIAX, J.M. Establishing orally self-administered cocaine as a reinforcer in rats using home-cage pre-exposure. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1998 Jan;22(1):229-39.

JESSOR, R.; JESSOR, S.L. Problem behavior and psychosocial development: A longitudinal study of youth. 1977. New York: Academic Press.

JOHNSON, V.; PANDINA, R.J. A longitudinal examination of the relationships among stress, coping strategies, and problems associated with alcohol use. Alcoholism: Clinical and experimental Research, 1993; 17:696-702.

JUPP, B.; DALLEY, J.W. Behavioral endophenotypes of drug addiction: etiological insights from neuroimaging studies. Neuropharmacology, 2014, 76, 487-497.

JUPP, B.; KRSTEW, E.; DEZSI, G.; LAWRENCE, A.J. Discrete cue-conditioned ethanol-seeking after protracted abstinence: pattern of neural activation and involvement of orexin(1) receptors. Br J Pharmacol 2011 162: 880–889.

KAIDANOVICH-BEILIN, O.; LIPINA, T.; VUKOBRADOVIC, I.; RODER, J.; WOODGETT, J.R. Assessment of social interaction behaviors. J Vis Exp. 2011 Feb 25;(48). pii: 2473.

KALIVAS, P.W.; DUFFY, P. Similar effects of daily cocaine and stress on mesocorticolimbic dopamine neurotransmission in the rat. Biological Psychiatry., v. 25, p. 913-928, 1991.

KALIVAS, P.W.; STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. Brain Res Brain Res Rev. 1991 Sep-Dec;16(3):223-44.

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. 1984 Jul;74(7):660-6.

KANDEL, D.B.; YAMAGUCHI, K. Developmental patterns of the use of legal, illegal, and medically prescribed psychotropic drugs from adolescence to young adulthood. NIDA Research monograph, 1985; 56:193-235.

KARATAYEV, O.; BARSON, J.; CARR, A.; BAYLAN, J.; CHEN, Y.; LEIBOWITZ, S. Predictors of ethanol consumption in adult Sprague-Dawley rats: relation to hypothalamic peptides that stimulate ethanol intake. Alcohol 2010 44:323–334.

KAWAKAMI, S.E.; QUADROS, I.M.; MACHADO, R.B.; SUCHECKI, D. Sex-dependent effects of maternal separation on plasma corticosterone and brain monoamines in response to chronic ethanol administration. Neuroscience 253, 55–66. 2010.

KELLOGG, C.K.; AWATRAMANI, G.B.; PIEKUT, D.T. Adolescent development alters stressor-induced FOS immunoreactivity in rat brain. Neuroscience 1998;83:681 – 9.

KIM, A.K.; BROWN, R.M.; LAWRENCE, A.J. The role of orexins/hypocretins in alcohol use and abuse: an appetitive-reward relationship. Front Behav Neurosci 2012 6: 78.

KIM, Y.T.; SOHN, H.; JEONG, J. Delayed transition from ambiguous to risky decision making in alcohol dependence during Iowa gambling task. Psychiatry Res. 2011;190:297–303.

KING, A.C.; DE WIT, H.; MCNAMARA, P.J.; CAO, D. Rewarding, stimulant, and sedative alcohol responses and relationship to future binge drinking. Arch Gen Psychiatry. 2011;68:389–399.

KLEIN, L.C. Effects of adolescent nicotine exposure on opioid consumption and neuroendocrine responses in adult male and female rats. Experimental and Clinical Psychopharmacology, 2001; 9:251-61.

KLEIN, L.C.; STINE, M.M.; VANDENBERGH, D.J.; WHETZEL, C.A.; KAMENS, H.M. Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2004; 78: 13-25.

KLEIN, N.; GAZOLA, A.C.; DE LIMA, T.C.; SCHENKEL, E.; NIEBER, K.; BUTTERWECK, V. Assessment of sedative effects of Passsiflora edulis f. flavicarpa and Passiflora alata extracts in mice, measured by telemetry. Phytother Res. 28 (5), 706–713. 2014.

KLIETHERMES, C.L.; CRABBE, J.C. Genetic independence of mouse measures of some aspects of novelty seeking. Proc Natl Acad SciU S A 2006;103(March(13)):5018–23.

KOOLHAAS, J.M. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. Brain Behav Immun 2008 22:662–667.

KOOLHAAS, J.M.; DE BOER, S.F.; COPPENS, C.M.; BUWALDA, B. Neuroendocrinology of coping styles: towards understanding the biology of individual variation. Front Neuroendocrinol 2010 31:307–321.

KOOLHAAS, J.M.; KORTE, S.M.; DE BOER, S.F.; VAN DER VEGT, B.J.; VAN REENEN, C.G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I.C.; RUIS, M.A.W.; BLOKHUIS, H.J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress- physiology. Neurosci. Biobehav. 1999 Rev. 23, 925–935.

KOROS, E.; PIASECKI, J.; KOSTOWSKI, W.; BIENKOWSKI, P. Saccharin drinking rather than open field behaviour predicts initial ethanol acceptance in Wistar rats. Alcohol 1998 33:131–140.

KOVAL, J.J.; PEDERSON, L.L.; CHAN, S.S.H. Psychosocial variables in a cohort of students in grades 8 and 11: A comparison of current and never smokers. Preventive Medicine. 2004; 39:1017–1025.

KREBS, R.M.; HEIPERTZ, D.; SCHUETZE, H.; DUZEL, E. Novelty increases the mesolimbic functional connectivity of the substantia nigra/ventral tegmental area (SN/VTA) during reward anticipation: Evidence from high-resolution fMRI. NeuroImage. 2011; 58:647–655.

LARANJEIRAS, R.; RIBEIRO, M. Aevolução do conceito de dependência química. In: Gigliottti, A. Guimarães, A. Dependência, Compulsão e Impulsividade. Rio de Janeiro: Rubio, 2006. Cap.6

LAVIOLA, G., ADRIANI, W., TERRANOVA, M.L., GUERRA, G. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models.Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 1999; 23: 993-1010.

LAVIOLA, G.; MACRI, S.; MORLEY-FLETCHER, S.; ADRIANI, W. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2003; 27: 9-31.

LAWRENCE, A.J.; COWEN, M.S.; YANG, H.J.; CHEN, F.; OLDFIELD, B. The orexin system regulates alcohol-seeking in rats. Br J Pharmacol 2006 148: 752–759.

LÁZARO-MUÑOZ, G.; LEDOUX, J.E.; CAIN, C.K. Sidman instrumental avoidance initially depends on lateral and basal amygdala and Is constrained by central amygdala-mediated pavlovian processes. Biol Psychiatry 2010 67:1120 –1127.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 2000 23:155–184.

LEE, H.; JANG, M.; KIM, W.; NOH, J. Differential effects of pair housing on voluntary nicotine consumption: a comparison between male and female adolescent rats. Psychopharmacology (Berl). 2017 Aug;234(16):2463-2473.

LEJUEZ C.W.; AKLIN, W.M.; JONES, H.A.; RICHARDS, J.B.; STRONG, D.R.; KAHLER, C.W., READ, J.P. The balloon analogue risk task (BART) differentiates smokers and nonsmokers. Exp. Clin. Psychopharmacol. 2003 11, 26–33.

LENDE, D.H.; SMITH, E.O. Evolution meets biopsychosociality: an analysis of addictive behavior. Addiction. 2002 Apr;97(4):447-58.

LEWIS, D.A. Development of the prefrontal cortex during adolescence: Insights into vulnerable neural circuits in schizophrenia. Neuropsychopharmacology 16: 385-98, 1997.

LI, J.; HU, Z.; DE LECEA, L. The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions. Br J Pharmacol. 2014;171:332–50.

LI, T.K. Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking. J Stud Alcohol. 2000 Jan;61(1):5-12. Review.

LIGHTHALL, N.; MATHER, M.; GORLICK, M. Acute stress increases sex differences in risk seeking in the balloon analogue risk task. PLoS ONE 2009 4:e6002.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology (Berl). 1987;92(2):180-5.

LITTLE, H.J. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking.Alcohol research & health: The journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2000; 24:215-24.

MACKILLOP, J.; AMLUNG, M.T.; FEW, L.R.; RAY, L.A.; SWEET, L.H.; MUNAFÒ, M.R. Delayed reward discounting and addictive behavior: a meta-analysis. Psychopharmacology 2011 216, 305–321.

MACRI, S.; ADRIANI, W.; CHIAROTTI, F.; LAVIOLA, G. Risk-taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. Anim Behav 2002 64: 541-546

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. 2008. Addiction 103 (Suppl. 1), 7–22.

MAHLER, S.V.; MOORMAN, D.E.; SMITH, R.J.; JAMES, M.H.; ASTON-JONES, G. Motivational activation: a unifying hypothesis of orexin/hypocretin function. Nat Neurosci. 2014;17:1298–303.

MAHLER, S.V.; SMITH, R.J.; MOORMAN, D.E.; SARTOR, G.C.; ASTON-JONES, G. Multiple roles for orexin/hypocretin in addiction. Prog Brain Res. 2012;198:79–121.

MANHÃES, A.C.; GUTHIERREZ, M.C.; FILGUEIRAS, C.C.; ABREU-VILLAÇA, Y. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. Behav Brain Res. 2008 Nov 21;193(2):216-24.

MANNUCCI, C.; TEDESCO, M.; BELLOMO, M.; CAPUTI, A. P.; CALAPAI, G. Long-term effects of nicotine on the forced swimming test in mice: an experimental model for the study of depression caused by smoke. Neurochem. Int. 2006;49:481-6.

MANSVELDER, H.D.; MCGEHEE, D. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. Journal of Neurobiology, 2002; 53: 606-17.

MANZO, L.; GOMEZ, M.J.; CALLEJAS-AGUILERA, J.E.; DONAIRE, R.; SABARIEGO, M.; FERNANDEZ-TERUEL, A.; CANETE, A.; BLAZQUEZ, G.; PAPINI, M.R.; TORRES, C. Relationship between ethanol preference and sensation/novelty seeking. Physiol Behav. 2014; 133:53–60.

MARCUS, J.N.; ASCHKENASI, C.J.; LEE, C.E.; CHEMELLI, R.M.; SAPER, C.B.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J.K. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. J Comp Neurol. 2001;435:6–25.

MARTIN, A.L.; BROWN, R.E. The lonely mouse: verification of a separation-induced model of depression in female mice. Behav. Brain Res. 207, 196–207. 2010.

MARTIN, C.A.; KELLY, T.H.; RAYNES, M.K.; BROGLI, B.R.; BRENZEL, A.; SMITH, W.J.; OMAR, H.A. Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence. Journal of the American Academy Child Adolescent Psychiatry, 2002; 41:1495-502.

MASON, W. "Over-all" hormonal balance as a key to endocrine organization. Psychosomatic Medicine 1968 30, 791-808.

MCBRIDE, W. J., BELL, R. L., RODD, Z. A., STROTHER, W. N., & MURPHY, J. M. Adolescent alcohol drinking and its long-range consequences. Studies with animal models. Recent Developments in Alcoholism, 2005, 17, 123e142.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropharmacology of defense: fear/anxiety and defensive distance. Neurosc. and Biobehav. Rev.,v. 28, p. 285-305. 2004.

MIAO H, LIU C, BISHOP K, GONG ZH, NORDBERG A, ZHANG X. Nicotine exposure during a critical period of development leads to persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. Journal of neurochemistry, 1998; 70:752-62.

MIECH, R.A.; JOHNSTON, L.D.; O'MALLEY, P.M.; BACHMAN, J.G.; PATRICK, M.E. Trends in Adolescent Vaping, 2017–2019. N Engl J Med 2019 381:15, 1490-1491.

MIKICS, E.; BARSY, B.; BARSVARI, B.; HALLER, J. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. Hormones and Behavior 2005 48, 152-162.

MINEUR, Y.S.; BELZUNG, C.; CRUSIO, W.E. Effects of chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. Behav. Brain Res. 175, 43–50, 2006.

MISSLIN, R.; BOUCHON, R.; ROPARTZ, P. Significance of behavioral parameters in mice in open field. Physiology & Behavior 1976 17, 767–770.

MITCHELL, S.H. Measures of impulsivity in cigarette smokers and non-smokers. Psychopharmacology (Berl), 1999; 146: 455-64.

MOELLER F.G.; DOUGHERTY, D.M. Impulsivity and substance abuse: what is the connection? Addict. Disord. Their Treat. 2001 1, 3–10.

MONTGOMERY, K.C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. J Comp Physiol Psychol 1955 48:254–260

MOORMAN, D.E.; ASTON-JONES, G. Orexin-1 receptor antagonismo decreases ethanol consumption and preference selectively in high-ethanol-preferring Sprague-Dawley rats. Alcohol 2009 43: 379–386.

NADAL, R.; ARMARIO, A.; JANAK, P.H. Positive relationship between activity in a novel environment and operant ethanol self-administration in rats. Psychopharmacology (Berl). 2002; 162:333–338.

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE (NIDA). NIDA Research Report Series: Nicotine Addiction (NIH Publication No. 98–4342). 1998. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services.

NELSON, D.A.; GIOVINO, G.A.; SHOPLAND, D.R.; MOWERY, P.D.; MILLS, S.L.; ERIKSEN, M.P. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. American Journal of Public Health, 1995; 85:34-40.

NOLLEY, E.P.; KELLEY, B.M. Adolescent reward system perseveration due to nicotine: studies with methylphenidate. Neurotoxicology and Teratololy, 2007; 29: 47-56.

NUTT, D.J. The pharmacology of human anxiety. Pharmacol Ther, [S.I.], v. 47, p. 233-266, 1990.

O´BRIEN, C.P. Drug Addiction and abuse. In: HARDMAN, J.D.; LIMBIRD, L.E. (Eds). Goodman and Gilman´s the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th Ed., Pregamon, New York, p. 621-642, 2006.

O'DONNELL, P. Adolescent maturation of cortical dopamine. Neurotox Res, 2010, 18, 306–312.

OLIVEIRA-DA-SILVA, A.; VIEIRA, F.B.; CRISTINA-RODRIGUES, F.; FILGUEIRAS, C. C.; MANHÃES, A.C.; ABREU-VILLAÇA, Y. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. Int J Dev Neurosci. 2009; 27:539-48.

OLMSTEAD, M.C. Animal models of drug addiction: where do we go from here? Q J Exp Psychol (Colchester) 2006;59:625–653.

O'LOUGHLIN, J.; KISHCHUK, N.; DI FRANZA, J.; TREMBLAY, M.; PARADIS, G. The hardest thing is the habit: a qualitative investigation of adolescent smokers' experience of nicotine dependence. Nicotine Tobacco Res. 4: 201-209. 2002.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPS). Banco mundial (BM) - La epidemia del tabaquismo. 2000. Publicación científica Nº 577.

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, 1999; 144: 54-60.

PASUMARTHI, R.K.; REZNIKOV, L.R.; FADEL, J. Activation of orexin neurons by acute nicotine. Eur J Pharmacol 2006 535: 172–176.

PAYLOR, R.; CRAWLEY, J.N. Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. Psychopharmacology 132, 169–180. 1997.

PELLOUX, Y.; COSTENTIN, J.; DUTERTE-BOUCHER, D. Novelty preference predictsplace preference conditioning to morphine and its oral consumption in rats. Pharmacol Biochem Behav 2006 84:43–50

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods. 1985 Aug;14(3):149-67.

PERRY, J.L.; CARROLL, M.E. The role of impulsive behavior in drug abuse. Psychopharmacology (Berl) 2008;200:1–26.

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

PETRY, N.M. Delay discounting of money and alcohol in activelyusing alcoholics, currently abstinent alcoholics, and controls.Psychopharmacology 2001 154:243–250

PEYRON, C.; TIGHE, D.K.; VAN DEN POL, A.N.; DE LECEA, L.; HELLER, H.C.; SUTCLIFFE, J.G.; KILDUFF, T.S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. J Neurosci. 1998;18:9996–10015.

PIAZZA, P.; DEMINIÈRE, J.; MACCARI, S.; MORMÈDE, P.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration. Behav Pharmacol 1990 1:339–345.

PIAZZA, P.V.; DEMINIERE, J.M.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. Science. 1989; 245:1511–1513.

PISU, M.G.; MOSTALLINO, M.C.; DOREA, R.; MACIOCCO, E.; SECCI, P.P.; SERRA, M. Effects of voluntary ethanol consumption on emotional state and stress responsiveness in socially isolated rats. Eur Neuropsychopharmacol, vol. 21, nº 5, 2011, p. 414–425.

PLANETA, C.S.; MARIN, M.T. Effects of cocaine in periadolescent rats with or without early maternal separation. Brazilian Journal of Medical and Biological Research., v. 35, p. 1367-1371, 2002.

PLAZA-ZABALA, A.; FLORES, A.; MALDONADO, R.; BERRENDERO, F. Hypocretin/orexin signaling in the hypothalamic paraventricular nucleus is essential for the expression of nicotine withdrawal. Biol Psychiatry 2012 71: 214–223.

PLAZA-ZABALA, A.; MARTIN-GARCIA, E.; DE LECEA, L.; MALDONADO, R.; BERRENDERO, F. Hypocretins regulate the anxiogenic-like effects of nicotine and induce reinstatement of nicotine-seeking behavior. J Neurosci 2010 30: 2300–2310.

POLLOCK, N.K.; MARTIN, C.S. Diagnostic orphans: adolescents with alcohol symptom who do not qualify for DSM-IV abuse or dependence diagnoses. The American Journal of psychiatry, 1999;156: 897-901.

PORCELLI, A.J.; DELGADO, M.R. Acute stress modulates risk taking in financial decision making. Psychol Sci. 2009 Mar;20(3):278-83.

POULOS, C.X.; PARKER, J.L.; LE, D.A. Increased impulsivity after injected alcohol predicts later alcohol consumption in rats: evidence for "loss-of-control drinking" and marked individual differences. Behavioral Neuroscience, 1998; 112: 1247-57.

PRIMUS, R.J.; KELLOGG, C.K. Pubertal-related changes influence the development of environment-related social interaction in the male rat. Developmental Psychobiology, 1989; 22: 633-43.

PRINCE, C.D.; RAU, A.R.; YORGASON, J.T.; ESPAÑA, R.A. Hypocretin/Orexin regulation of dopamine signaling and cocaine self-administration is mediated predominantly by hypocretin receptor 1. ACS Chem Neurosci. 2015 Jan 21;6(1):138-46.

REY, A.A.; PURRIO, M.; VIVEROS, M.-P.; LUTZ, B. Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABAB receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. Neuropsychopharmacology 2012 37, 2624–2634.

RIBEIRO, R.L.; DE LIMA, T.C.M. Participation of GABAA receptors in the modulations of experimental anxiety by tachykinin agonists and antagonists in mice. Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatr. 26 (5), 861–869. 2002.

RIBEIRO-CARVALHO, A.; LIMA, C.S.; FILGUEIRAS, C.C.; MANHÃES, A.C.; ABREU-VILLAÇA, Y. Nicotine and ethanol interact during adolescence: effects on the central cholinergic systems. 2008. Brain Res. Sep 26;1232:48-60.

RIBEIRO-CARVALHO, A.; LIMA, C.S.; NUNES-FREITAS, A.L.; FILGUEIRAS, C.C.; MANHÃES, A.C.; ABREU-VILLAÇA, Y. Exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on depressive-like behavior during exposure and withdrawal. 2011. Behav Brain Res. Aug 1;221(1):282-9.

RICHARDS, J.K.; SIMMS, J.A.; STEENSLAND, P.; TAHA, A.S.; BORGLAND, S.L.; BONCI, A.; BARTLETT, S.E. Inhibition of orexin-1/hypocretin-1 receptors inhibits yohimbine-induced reinstatement of ethanol and sucrose seeking in Long-Evans rats. Psychopharmacology (Berl) 2008 199: 109–117.

ROBERTS, A.J.; MCDONALD, J.S.; HEYSER, C.J.; KIEFFER, B.L.; MATTHES, H.W.; KOOB, G.F.; GOLD, L.H. mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. J Pharmacol Exp Ther. 2000 Jun;293(3):1002-8.

ROBINSON, T.E.; BECKER, J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chornic amphetamine administration: a rewien and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. Brain Research Reviews, v. 11, p. 157-189, 1986.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. Addiction. Annu Rev Psychol, v.54, p.25-53, 2003.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. Incentive-sensitization and addiction. Addiction, v.96, p.103-114, 2001.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. Brain Res Rev, v.18, p.247-291, 1993.

ROBINSON, T.E; BERRIDGE, K.C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. Addiction, v. 95, p. 91-117, 2000.

RODGERS, R.J.; BOULLIER, E.; CHATZIMICHALAKI, P.; COOPER, G.D.; SHORTEN, A. Contrasting phenotypes of C57BL/6JOlaHsd, 129S2/SvHsd and 129/SvEv mice in two exploration-based tests of anxiety-related behaviour. Physiol Behav. 2002 Nov;77(2-3):301-10.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. Braz J Med Biol Res.,v. 30, p. 289–304, 1997.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. Physiol Behav. 1993 Feb;53(2):383-8.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In COOPER, S.J.; HENDRIE, C.A. (Orgs.), Ethol Psychopharmacol., p. 9-43. Nova York: Wiley, 1994.

RODGERS, R.J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. Neurosci Biobehav Rev. 1997 Nov;21(6):801-10. Review.

RODGERS, R.J.; DAVIES, B.; SHORE, R. Absence of anxiolytic response to chlordiazepoxide in two common background strains exposed to the elevated plus-maze: importance and implications of behavioural baseline. Genes Brain Behav. 2002 Nov;1(4):242-51.

RODGERS, R.J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T.J.; BRAIN, P.F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. Physiology and Behavior 1999 68, 47-53.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. Pharmacol Biochem Behav. 1995 Oct;52(2):297-303.

ROOZENDAAL, B.; BOHUS, B.; MCGAUGH, J.L. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. Psychoneuroendcocrinology 1996 21, 681-693.

ROY, V.; CHAPILLON, P. Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. Behavioural Brain Research 2004 154, 439–448.

RUSSO, S.J.; MURROUGH, J.W.; HAN, M.-H.; CHARNEY, D.S.; NESTLER, E.J. Neurobiology of resilience. Nat. Neurosci. 2012 15, 1475–1484.

SAKURAI, T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. Nat Rev Neurosci. 2007;8:171–81.

SAKURAI, T. The role of orexin in motivated behaviours. Nat Rev Neurosci. 2014;15:719–31.

SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R.M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S.C.; RICHARDSON, J.A.; KOZLOWSKI, G.P.; WILSON, S.; ARCH, J.R.; BUCKINGHAM, R.E.; HAYNES, A.C.; CARR, S.A.; ANNAN, R.S.; MCNULTY, D.E.; LIU, W.S.; TERRETT, J.A.; ELSHOURBAGY, N.A.; BERGSMA, D.J.; YANAGISAWA, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell. 1998;92:573–85.

SAKURAI, T.; NAGATA, R.; YAMANAKA, A.; KAWAMURA, H.; TSUJINO, N.; MURAKI, Y.; KAGEYAMA, H.; KUNITA, S.; TAKAHASHI, S.; GOTO, K.; KOYAMA, Y.; SHIODA, S.; YANAGISAWA, M. Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. Neuron. 2005;46:297–308.

SALGADO, J.V.; MALLOY-DINIZ, L.F.; CAMPOS, V.R.; ABRANTES, S.S.; FUENTES, D.; BECHARA, A.; CORREA, H. Neuropsychological assessment of im-pulsive behavior in abstinent alcohol-dependent subjects. Rev Bras Psiquiatr 2009 31:4–9

SARVIHARJU, M.; JAATINEN, P.; HYYTIÄ, P.; HERVONEN, A.; KIIANMAA, K. Effects of lifelong ethanol consumption on drinking behavior and motor impairment of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. Alcohol, 2001, 23, 157e166.

SCHLUND, M.W.; SIEGLE, G.J.; LADOUCEUR, C.D.; SILK, J.S.; CATALDO, M.F.; FORBES, E.E.; DAHL, R.E.; RYAN, N.D. Nothing to fear? Neural systems supporting avoidance behavior in healthy youths. Neuroimage 2010 52:710 –719.

SERLIN, H.; TORREGROSSA, M.M. Adolescent rats are resistant to forming ethanol seeking habits. Developmental Cognitive Neuroscience, 2015, 16, 183e190.

SHOBLOCK, J.R.; WELTY, N.; ALUISIO, L.; FRASER, I.; MOTLEY, S.T.; MORTON, K.; PALMER, J.; BONAVENTURE, P.; CARRUTHERS, N.I.; LOVENBERG, T.W.; BOGGS, J.; GALICI, R. Selective blockade of the orexin-2 receptor attenuates ethanol self-administration, place preference, and reinstatement. Psychopharmacology (Berl) 2011 215: 191–203.

SIMMS, J.A.; BITO-ONON, J.J.; CHATTERJEE, S.; BARTLETT, S.E. Long-Evans rats acquire operant self-administration of 20% ethanol without sucrose fading. Neuropsychopharmacology, vol. 35, 2010, p. 1453–1463.

SINNOT, R.S.; PHILLIPS, T.J.; FINN, D.A. Alteration of voluntary ethanol and saccharin consumption by the neurosteroid allopregnanolone in mice. Psychopharmacology, vol. 162, 2002, p.438–447.

SLAWECKI, C.J. Comparison of anxiety-like behavior in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. Behavioral Neuroscience, 2005; 119: 1477-83.

SLAWECKI, C.J.; EHLERS, C.L. Lasting effects of adolescent nicotine exposure on the electroencephalogram, event related potentials, and locomotor activity in the rat. Brain Research. Developmental Brain Research, 2002; 138:15-25.

SLAWECKI, C.J.; GILDER, A.; ROTH, J.; EHLERS, C.L. Increased anxiety-like behavior in adult rats exposed to nicotine as adolescents. Pharmacology, Biochemistry and Behavioral, 2003; 75: 355-361.

SLAWECKI, C.J.; THORSELL, A.; EHLERS, C.L. Long-term neurobehavioral effects of alcohol or nicotine exposure in adolescent animal models. Annals of the New York Academy of sciences, 2004; 1021: 448-52.

SMITH, J.L.; MATTICK, R.P.; JAMADAR, S.D.; IREDALE, J.M. Deficits in behavioural inhibition in substance abuse and addiction: a meta-analysis. Drug Alcohol Depend. 2014 145, 1–33.

SMITH, R.J.; SEE, R.E.; ASTON-JONES, G. Orexin/hypocretin signaling at the orexin 1 receptor regulates cue-elicited cocaine-seeking. Eur J Neurosci 2009 30: 493–503.

SOUTHWICK, S.M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D.S. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. Ann. Rev. Clin. Psychol. 2005 1, 255–291.

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. Alcohol Research & Health - Recent Animal Models of Alcoholism. Vol. 24, nº. 2, 2000, p. 124-131.

SPANAGEL, R.; HOLTER, S.M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. J Neural Transm. Vol.107, 2000, p. 669-680.

SPEAR, L. Modeling Adolescent Development and Alcohol Use in Animals. Alcohol Res Health. 24(2):115-23. 2000.

SPEAR, L.P. Adolescent brain development and animal models. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004, 1021, 23e26.

SPEAR, L.P. Adolescent period: Biological basis of vulnerability to develop alcoholism and other ethanol-mediated behaviors. In A. Noronha, M. Eckardt, & K. Warren (Eds.), Review of NIAAA's Neuroscience and Behavioral Research Portfolio (NIAAA Research Monograph 34, NIH pub. No. 00-4520 ed (pp. 315e333). 2000c. Bethesda, MD: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.

SPEAR, L.P. Consequences of adolescent use of alcohol and other drugs: Studies using rodent models. Neurosci Biobehav Rev. 2016 Nov;70:228-243.

SPEAR, L.P. Neurobehavioral changes in adolescence. Current Directions in Psychological Science, 2000b, 9, 111e114.

SPEAR, L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2000a, 24, 417e463.

SPEAR, L.P. The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. Journal of Study Alcohol Supplement, 2002; 14: 71-81.

SPEAR, L.P. The developing brain and adolescent-typical behavior patterns: An evolutionary approach. In D. Romer, R.F. Walker, Annenberg Public Policy Center, & Annenberg Foundation Trust at Sunnylands (Eds.), Adolescent psychopathology and the developing brain: Integrating brain and prevention science (pp. 9e30). 2007. Oxford: Oxford University Press.

SPEAR, L.P.; SHALABY, I.A.; BRICK, J. Chronic administration of haloperidol during development: behavioral and psychopharmacological effects. Psychopharmacology, 1980; 70: 47-58.

SPEAR, L.P.; VARLINSKAYA, E.I. Adolescence. Alcohol sensitivity, tolerance, and intake. Recent Developments in Alcoholism, 2005, 17, 143e159.

SRINIVASAN, S.; SIMMS, J.A.; NIELSEN, C.K.; LIESKE, S.P.; BITO-ONON, J.J.; YI, H.; HOPF, F.W.; BONCI, A.; BARTLETT, S.E. The dual orexin/hypocretin receptor antagonist, almorexant, in the ventral tegmental area attenuates etanol self-administration. PLoS ONE 2012 7: e44726.

STEVENSON, J.R.; YOUNG, K.A.; BOHIDAR, A.E.; FRANCOMACARO, L.M.; FASOLD, T.R.; BUIRKLE, J.M.; NDEM, J.R.; CHRISTIAN, S.C. Alcohol Consumption Decreases Oxytocin Neurons in the Anterior Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus in Prairie Voles. Alcohol Clin Exp Res. 2017 Aug;41(8):1444-1451.

STOLERMAN, I.P.; SHOAIB, M. The neurobiology of tobacco addiction. Trends in Pharmacological Science. 1991; 12:467-73.

SUEMARU, K.; YASUDA, K.; CUI, R.;, LI, B.; UMEDA, K.; AMANO, M.; MITSUHASHI, H.; TAKEUCHI, N.; INOUE, T.; GOMITA, Y.; ARAKI, H. Antidepressant-like action of nicotine in forced swimming test and brain serotonin in mice. Physiol. Behav. 2006;88:545-9.

SUTO, N.; AUSTIN, J.D.; VEZINA, P. Locomotor response to novelty predicts a rat's propensity to self-administer nicotine. Psychopharmacology (Berl). 2001; 158:175–180.

TARANTINO, L.M.; GOULD, T.J.; DRUHAN, J.P.; BUCAN, M. Behavior and mutagenesis screens: the importance of baseline analysis of inbred strain. Mamm. Genome 11, 555–564. 2000.

TARTER, R.E. Are there inherited behavioral traits that predispose to substance abuse? Journal of Consulting and Clinical Psychology 1988;56:189–196.

TARTER, R.E.; SAMBRANO, S.; DUNN, M.D. Predictor variables by developmental stages: A Center for Substance Abuse Prevention multisite study. Psychology of Addictive Behaviors 2002;16:S3–S10.

TEICHER, M.H.; ANDERSEN, S, L.; POLCARI, A.; ANDERSON, C.M.; NAVALTA, C.P., KIM, D.M. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2003; 27: 33-44.

TEXEIRA, R.M.; DUARTE, F.S.; DE LIMA, T.C.M. Behavioral and immunological effects of substance P in female and male mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 79 (1), 1–9. 2004.

THOMSEN, M.; RALPH, R.J.; CAINE, S.B. Psychomotor stimulation by dopamine D_1-like but not D_2-like agonists in most mouse strains. Exp Clin Psychopharmacol. 2011;19(5):342–360.

TOALSTON, J.E.; DEEHAN, G.A. Jr.; HAUSER, S.R.; ENGLEMAN, E.A.; BELL, R.L.; MURPHY, J.M.; MCBRIDE, W.J.; RODD, Z.A. The reinforcing properties of ethanol are quantitatively enhanced in adulthood by peri-adolescent ethanol, but not saccharin, consumption in female alcohol-preferring (P) rats. Alcohol, 2015, 49, 513e518.

TOBACCO ADVISORY GROUP; Royal College of Physicians. Nicotine addiction in Britain. London: RCP; 2000.

TOMASSINI, A.; STRUGLIA, F.; SPAZIANI, D.; PACIFICO, R.; STRATTA, P.; ROSSI, A. Decision making, impulsivity, and personality traits in alcohol-dependent subjects. Am J Addict 2012 21:263–267

TRAUTH, J.A.; MCCOOK; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Modeling adolescent nicotine exposure: effects on cholinergic systems in rat brain regions. Brain Research, 2000; 873: 18-25.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P.J.; VANDERSCHUREN, L.J. Prosocial effects of nicotine and ethanol in adolescent rats through partially dissociable neurobehavioral mechanisms. Neuropsychopharmacology 2009 34:2560–2573.

TSCHANN, J.M.; ADLER, N.E.; IRWIN, JR. C.E.; MILLSTEIN, S.G.; TURNER, R.A., KEGELES, S.M. Initiation of substance use in early adolescence: the roles of pubertal timing and emotional distress. Health Psychology, 1994; 12: 326-33.

TUTTLE, A.H.; PHILIP, V.M.; CHESLER, E.J.; MOGIL, J.S. Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. Nat Methods. 2018 Dec;15(12):994-996.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION. Results from the 2007 National Survey on Drug use and Health: National findings. (DHHS publication No. SMA 08-4343, NSDUH Series H-34). 2008. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Office of Applied Studies.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. The Health Consequences of Smoking: Nicotine Addiction. A Report of the Surgeon General, 1988. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Health Promotion and Education, Office on Smoking and Health. DHHS Publication No. (CDC) 88-8406, 1988.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Preventing tobacco use among young people: a report of the Surgeon General. Washington (DC): U.S. Government Printing Office, 1988.

VAN ERP, A.M.M.; MICZEK, K.A. Increased aggression after ethanol self-administration in male resident rats. Psychopharmacology, vol. 131, 1997, p. 287.295.

VAN GAALEN, M.M.; STECKLER, T. Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. Behav Brain Res. 2000 Oct;115(1):95-106.

VAN HEDGER, K.; BERSHAD, A.K.; LEE, R.; DE WIT, H. Effects of intranasal oxytocin on stress-induced cigarette craving in daily smokers. Nicotine Tob Res. 2018 Aug 1.

VANYUKOV, M.M.; TARTER, R.E.; KIRISCI, L.; KIRILLOVA, G.P.; MAHER, B.S.; CLARK, D.B. Liability to substance use disorders: 1. Common mechanisms and manifestations. Neurosci Biobehav Rev. 2003 Oct;27(6):507-15.

VERDEJO-GARCIA, A.; LAWRENCE, A.J.; CLARK, L. Impulsivity as a vulner-ability marker for substance-use disorders: review of findings from high-risk research, problem gamblers and genetic association studies. Neurosci Biobehav Rev 2008 32:777–810

VETTER, C.S.; DOREMUS-FITZWATER, T.L.; SPEAR, L.P. Time course of elevated ethanol intake in adolescent relative to adult rats under continuous, voluntaryaccess conditions. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2007, 31, 1159e1168.

VETTER-O'HAGEN, C.; VARLINSKAYA, E.; SPEAR, L. Sex differences in ethanol intake and sensitivity to aversive effects during adolescence and adulthood. Alcohol and Alcoholism, 2009, 44, 547e554.

VILLAS BOAS, G.R.; ZAMBONI, C.G.; PERETTI, M.C.; CORREIA, D.; RUEDA, A.V.L.; CAMARINI, R.; BRUNIALTI-GODARD, A.L.; BOERNGEN-LACERDA, R. GABAB receptor agonist only reduces ethanol drinking in light-drinking mice. Pharm Biochem Behav, vol. 102, 2012, p. 233–240.

VOLKOW, N.D.; LI, T.K. Drugs and alcohol: treating and preventive abuse, addiction and their medical consequences. Pharmacology and therapeutics, 2005; 108: 3-17.

VOON, V.; IRVINE, M.A.; DERBYSHIRE, K.; WORBE, Y.; LANGE, I.; ABBOTT, S.; MOREIN-ZAMIR, S.; DUDLEY, R.; CAPRIOLI, D.; HARRISON, N.A.; WOOD, J.; DALLEY, J.W., BULLMORE, E.T.; GRANT, J.E.; ROBBINS, T.W. Measuring "waiting" impulsivity in substance addictions and binge eating disorder in anovel analogue of rodent serial reaction time task. Biol Psychiatry 2013 75:148–155

VUCHINICH, R.E.; SIMPSON, C.A. Hyperbolic temporal discounting insocial drinkers and problem drinkers. Exp Clin Psychopharmacol 1998 6:292–305

WAHLSTROM, D.; COLLINS, P.; WHITE, T.; LUCIANA, M. Developmental changes in dopamine neurotransmission in adolescence: behavioral implications and issues in assessment. Brain Cogn. 2010 Feb;72(1):146-59.

WALKER, F.R.; MARCH, J., HODGSON, D.M. Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat. Behavioural Brain Research, 2004 23; 154: 63-9.

WALLACE Jr, J.M.; BACHMAN, J.G.; O'MARLLEY, P.M.; SCHULENBERG, J.E.; COOPER, S.M.; JOHNSTON, L.D. Gender and ethnic differences in smoking, drinking illict drug use among American 8 th, 10th and 12 th grade students, 1976-2000. Addiction, 2003; 98: 225-34.

WEBSTER, R.A.; HUNTER, M; KEATS, J.A. Peer and parental influences on adolescents' substance use: a path analysis. The international journal of the Addictions, 1994; 29: 647-57.

WHITE, V.; BYRNES, G.; WEBSTER, B.; HOPPER, J. Does smoking among friends explain apparent genetic effects on current smoking in adolescence and young adulthood? Br J Cancer 2008 98, 1475–1481.

WILLIE, J.T.; CHEMELLI, R.M.; SINTON, C.M.; TOKITA, S.; WILLIAMS, S.C.; KISANUKI, Y.Y.; MARCUS, J.N.; LEE, C.; ELMQUIST, J.K.; KOHLMEIER, K.A.; LEONARD, C.S.; RICHARDSON, J.A.; HAMMER, R.E.; YANAGISAWA, M. Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. Neuron 2003 38: 715–730.

WILLNER, P. Animal models as simulations of depression. Trends Pharmacol Sci. 1991b. Apr;12(4):131-6.

WILLNER, P. Methods for assessing the validity of animal models of human psychopathology. Animal models in psychiatry I – Neuromethods, vol. 18, 1991a, p.1-23.

WILLS, T.A. Stress and coping in early adolescence: relationships to substance use in urban school samples. Health Psychology, 1986; 5:503-29.

WILLS, T.A.; VACCARO, D.; MCNAMARA, G. Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: An application of Cloninger's theory. Journal of Substance Abuse 1994;6:1–20.

WISE, R.A. The role of reward pathways in the development of drug dependence. Pharmacol Ther. 1987;35(1-2):227-63.

WOLF, M.E.; WHITE, F.J.; NASSAR, R; BROODERSON, R.J.; KHANSA, M.R. Differential development of autoreceptor subsensitivity and enhanced dopamine release during amphetamine sensitization. The Journal or Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 264, p. 249-255, 1993.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Consultation on Tobacco and Youth: what in the world works? Singapore; 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mortality attributable to tobacco. Geneva: World Health Organization, 2012. 396p. (WHO Global Report).

YORK, J.L. Clinical significance of alcohol intake parameters at initiation of drinking. Alcohol 1999 19, 97e99.

YOSHIDA, K.; MCCORMACK, S.; ESPANA, R.A.; CROCKER, A.; SCAMMELL, T.E. Afferents to the orexin neurons of the rat brain. J Comp Neurol. 2006;494:845–61.

YOUNG, K.A.; GOBROGGE, K.L.; WANG, Z. The role of mesocorticolimbic dopamine in regulating interactions between drugs of abuse and social behavior. Neurosci Biobehav 2011 Rev 35:498–515.

YUAN, M.; CROSS, S.J.; LOUGHLIN, S.E.; LESLIE, F.M. Nicotine and the adolescent brain. J Physiol. 2015 Aug 15;593(16):3397-412.

ZANOS, P.; GEORGIOU, P.; METAXAS, A.; KITCHEN, I.; WINSKY-SOMMERER, R.; BAILEY, A. Region-specific up-regulation of oxytocin receptor binding in the brain of mice following chronic nicotine administration. Neurosci Lett. 2015 Jul 23;600:33-7.

ZAPATA, A.; CHEFER, V.I.; ATOR, R.; SHIPPENBERG, T.S.; ROCHA, B.A. Behavioural sensitization and enhanced dopamine response in the nucleus accumbens after intravenous cocaine self-administration in mice. Journal of Neuroscience, v. 17, p. 590-596, 2003.

ZHU, S.; SHI, R.; WANG, J.; WANG, J.F.; LI, X.M.Unpredictable chronic mild stress not chronic restraint stress induces depressive behaviours in mice. Neuroreport 25, 1151–1155. 2014.

ZUCKERMAN, M. Sensation seeking: Beyond the optimal level of arousal. Hillsdale, NJ: Erlbaum. 1979.

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

ZUCKERMAN, M.; KUHLMAN, D.M.; JOIREMAN, J.; TETA, P.; KRAFT, M. A Comparison of 3 Structural Models for Personality - the Big 3, the Big 5, and the Alternative 5. J Pers Soc Psychol. 1993; 65:757–768.

ZUCKERMAN, M.; NEEB, M. Sensation seeking and psychopathology. Psychiatry research. 1979; 1:255–264.