



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NICOTINA E/OU ETANOL NA
MEMÓRIA/APRENDIZADO DE CAMUNDONGOS C57BI/6 ADOLESCENTES

Ana Heloisa de Medeiros

Dissertação submetida à Universidade do
Estado do Rio de Janeiro para a obtenção
do grau de Mestre em Fisiopatologia
Clínica e Experimental

Rio de Janeiro
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NICOTINA E/OU ETANOL NA
MEMÓRIA/APRENDIZADO DE CAMUNDONGOS C57BI/6 ADOLESCENTES

Ana Heloisa de Medeiros

Dissertação submetida à Universidade do
Estado do Rio de Janeiro para a obtenção do
grau de Mestre em Fisiopatologia Clínica e
Experimental

Orientadora:
Profa. Dra. Yael de Abreu Villaça
Co-orientador:
Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Rio de Janeiro
2008



FICHA CATALOGRÁFICA

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

M488 Medeiros, Ana Heloisa de.
Efeitos da exposição à nicotina e/ou etanol na
memória/aprendizado de camundongos C57B1/6 adolescentes / Ana
Heloisa de Medeiros. – 2008.
xii,83f. : il.

Orientador : Yael de Abreu Villaça.

Co-orientador : Alex Christian Manhães.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Adolescência - Teses. 2. Memória - Efeitos das drogas - Teses.
3. Adolescência - Álcool - Teses. 4. Nicotina - Teses. I. Villaça, Yael
de Abreu. II. Manhães, Alex Christian. III. Universidade do Estado do
Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-053.7:615.78

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NICOTINA E/OU ETANOL NA
MEMÓRIA/APRENDIZADO DE CAMUNDONGOS C57BI/6 ADOLESCENTES

Ana Heloisa de Medeiros

Orientadora:
Profa. Dra. Yael de Abreu Villaça
Co-orientador:
Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Aprovada em 27 de fevereiro de 2008 pela banca examinadora:

Prof^ª. Dra. Andréa Monte Alto Costa

Prof. Dr. Frank Tenório de Almeida Costa

Prof. Dr. Gustavo Adolpho de Carvalho

Rio de Janeiro
2008



Ao meu querido avô
Luís Augusto de Medeiros
(*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, certeza essencial em minha vida.

À minha família, não lhes importando as dificuldades, me fizeram uma pessoa de bem e me deram meios para, hoje, estar aqui. Amo vocês!

Ao meu noivo Alyson, pela minha nova família, pelo incentivo e dedicação incondicionais, trazendo-me força e serenidade em todos os momentos. Seu amor tornou minha vida completa.

Aos meus inseparáveis amigos do CPII, CEACE, CDJA, UFRJ, INDC: “Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos.” (Vinícius de Moraes)

À orientadora e querida amiga Yael de Abreu Villaça, por ter me aceitado tão abertamente neste trabalho, pela confiança depositada em mim desde o início, por tudo que me foi ensinado ao longo do tempo (e ainda será!), a orientação segura, firme e precisa e, principalmente, a cumplicidade e amizade.

Ao “oráculo”, digo, querido co-orientador Alex Christian Manhães, agradeço a paciência, o apoio e a amizade. Em todas as ocasiões, com a definição perfeita da Fernanda, adoravelmente “ácido”.

Ao professor e amigo Cláudio Carneiro Filgueiras, pelo apoio e incentivo dado em todos os momentos da minha jornada sempre com irreverência e simplicidade. Você fará falta nesta comemoração...

Às amigas Anna Caroline, Carla e ‘Nathália-Michele’, ao me acompanharem tão de perto, tornaram-se imprescindíveis não apenas neste trabalho.

A todos os alunos e funcionários do laboratório, agradeço o convívio maravilhoso, o auxílio, o aprendizado, a troca e o apoio profissional e pessoal.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	<i>Página</i>
QUADRO 1 Estágios da intoxicação pelo álcool	11
QUADRO 2 Distribuição de camundongos por idade, sexo e tratamento	24
TABELA 1 Médias e erro padrão de ingesta/peso, consumo de nicotina e peso corporal	32
TABELA 2 Análise global dos efeitos em memória/aprendizado	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<i>Página</i>
FIGURA 1 Foto do equipamento de teste de esquiva passiva	27
FIGURA 2 Médias de ingesta/peso de fêmeas e machos	31
FIGURA 3 Médias de consumo de nicotina	32
FIGURA 4 Médias de peso de fêmeas	33
FIGURA 5 Médias de peso de machos	33
FIGURA 6 Médias de latência em PA1 e PA2 em PN44-45	35
FIGURA 7 Índice de memória/aprendizado (PA2-PA1)/PA1 em PN44-45	35
FIGURA 8 Médias de latência em PA1 e PA2 em PN49-50	36
FIGURA 9 Índice de memória/aprendizado (PA2-PA1)/PA1 em PN49-50	36
FIGURA 10 Médias de latência em PA1 e PA2 em PN74-75 em fêmeas	37
FIGURA 11 Médias de latência em PA1 e PA2 em PN74-75 em machos	37
FIGURA 12 Índice de memória/aprendizado (PA2-PA1)/PA1 em PN74-75	37
FIGURA 13 Efeitos da ansiedade	38

LISTA DE ABREVIÇÕES

ad lib	ad libitum
ANOVA	Análise de variância
ANOVAu	Análise de variância global univariada
ANOVAr	Análise de variância de repetição
B	Número de focos de fezes encontrado na câmara escura da caixa da esquiwa passiva
B/min	Unidade usada como medida de ansiedade
cm	Centímetros
E.P.M.	Erro padrão da média
ETOH	Grupo exposto ao etanol
F	Razão de Fischer
FPLSD	Fisher's Protected Least Significant Difference
g	Gramas
gl	Graus de liberdade
H	Horas
i.p.	Intra-peritoneal
Kg	Quilograma
K-W	Teste de Kruskal-Wallis
mA	Miliampére
ml	Mililitros
M-W	Teste U de Mann-Whitney
µg	Microgramas
n	Tamanho da amostra
NA	Núcleo acumbens
NIC	Grupo exposto à nicotina
NIC+ETOH	Grupo exposto à nicotina e ao etanol
P	Valor de prova
PA	Teste da Esquiwa Passiva ou Step-through passive avoidance box
PA1	1º dia de teste na esquiwa passiva
PA2	2º dia de teste na esquiwa passiva
PN	Dia pós-natal
PN45	45º dia pós-natal
PN50	50º dia pós-natal
PN75	75º dia pós-natal
s	Segundo (s)
τ	Coefficiente não-paramétrico de Kendall
v/v	Volume/volume
VEH	Grupo controle

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
LISTA DE QUADROS E TABELAS	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE ABREVIACÕES	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 A adolescência	1
1.1.1 Um período de suscetibilidade ao uso de drogas	2
1.1.2 Suscetibilidade neurobiológica	4
1.2 Tabaco	6
1.2.1 Mecanismos neurofisiológicos de ação da nicotina	7
1.3 Álcool	9
1.3.1 Mecanismos neurofisiológicos de ação do etanol	12
1.4 O co-abuso	14
1.5 Efeitos cognitivos de nicotina e etanol	17
2 - OBJETIVOS	21
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Distribuição dos animais por grupo experimental	23
3.2.1 Grupo exposto à nicotina e ao etanol (NIC+ETH)	23
3.2.2 Grupo exposto à nicotina (NIC)	24
3.2.3 Grupo exposto ao etanol (ETH)	24
3.2.4 Grupo controle (VEH)	24
3.3 Tratamento	25
3.3.1 Administração de nicotina e etanol e medidas de peso e ingesta	25
3.4 Testes comportamentais	26
3.4.1 A esQUIVA passiva	26
3.4.2 Índice de Memória/Aprendizado	27
3.5 Análise estatística	28

3.5.1	Análise da relação consumo de líquido/peso corporal, consumo de nicotina e peso corporal	28
3.5.2	Análise de PA1, PA2 e do índice (PA2-PA1)/PA1	28
3.5.3	Análise da interação entre nicotina e etanol	29
3.5.4	Medida e análise da ansiedade	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Efeitos da ingesta/peso, consumo de nicotina e peso corporal	31
4.2	Análise estatística global das medidas de memória/aprendizado	33
4.3	Efeitos de memória/aprendizado	34
4.3.1	PN44-45	34
4.3.2	PN49-50	35
4.3.3	PN74-75	36
4.4	Efeitos de ansiedade	37
5	DISCUSSÃO	39
5.1	Considerações metodológicas	39
5.2	Efeitos da exposição na adolescência na memória/aprendizado	41
5.3	Efeitos do curto período de retirada na memória/aprendizado	42
5.4	Efeitos do longo período de retirada na memória/aprendizado	43
5.5	Efeitos da ansiedade	45
5.6	Efeitos neurobiológicos de nicotina e etanol	45
6	CONCLUSÕES	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7.1	Sítios consultados	70
8	ANEXO: Artigo	72
	Yael de Abreu-Villaça, Ana Heloisa de Medeiros, Carla S. Lima, Felipe P. Faria, Cláudio C. Filgueiras, Alex C. Manhães. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. Behavioural Brain Research 181 (2007) 136–146.	

RESUMO

Adolescentes humanos freqüentemente associam o fumo do tabaco ao consumo de bebidas alcoólicas. Apesar desta freqüente associação, pouco se sabe sobre a neurobiologia básica da dupla exposição no cérebro adolescente. No presente trabalho, avaliamos, através da caixa da esquiva passiva (2 mA, 2 s; intervalo entre teste-reteste de 24 h), os efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência (dias pós-natais 30 a 45: PN30-45), num curto e longo períodos de retirada, em quatro grupos de camundongos C57Bl/6 machos e fêmeas: (1) exposição concomitante à NIC [solução de nicotina free base (50 µg/ml) em sacarina a 2% para beber] e ETOH [solução de etanol (25%, 2 g/kg) injetadas i.p. em dias alternados]; (2) exposição a NIC; (3) exposição ao ETOH; (4) controle. Durante a exposição (PN44-45), déficits na memória/aprendizado devido à exposição concomitante a NIC+ETOH refletiram a soma dos dois efeitos individuais. Durante o curto período de retirada (PN49-50), a nicotina melhorou a memória/aprendizado, entretanto, o etanol bloqueou as melhoras induzidas pela nicotina. Um mês após a exposição (PN74-75), uma melhora significativa na memória/aprendizado somente em fêmeas foi observada como um resultado da co-administração. Em conclusão, nossos resultados sugerem que os efeitos deletérios da exposição à nicotina e ao etanol na memória/aprendizado representam uma piora do resultado na dupla exposição. Entretanto, os efeitos negativos da exposição combinada não persistem durante a retirada. De fato, a exposição combinada promove um efeito benéfico tardio sexo-dependente na memória/aprendizado durante a retirada.

ABSTRACT

In the present work we assessed, through the use of the step-through passive avoidance box (2mA, 2s; test-retest interval of 24 hours), short- and long-term memory/learning effects of nicotine (NIC) and/or ethanol (ETOH) exposure during adolescence (postnatal days 30 to 45: PN30-45) in four groups of male and female C57BL/6 mice: 1) Concomitant NIC [nicotine free base solution (50µg/ml) in 2% saccharin to drink] and ETOH [ethanol solution (25%, 2g/kg) i.p. injected every other day] exposure; 2) NIC exposure; 3) ETOH exposure; 4) Vehicle. During exposure (PN44-45), deficits in memory/learning due to concomitant NIC+ETOH exposure reflected the summation of the two individual sets of effects. During a short-term drug withdrawal (PN49-50), nicotine improved memory/learning; however ethanol blocked nicotine-induced improvements. One month post-exposure (PN74-75), a significant female-only improvement in memory/learning was observed as a result of co-administration. In conclusion, our results suggest that detrimental effects of nicotine and ethanol on memory/learning during adolescent combined exposure represent a worsened outcome from the dual exposure. However, negative effects of the combined exposure fail to persist during withdrawal. In fact, the combined exposure elicits a sex-dependent late onset beneficial effect on memory/learning during withdrawal.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A adolescência

A adolescência é descrita como a transição da infância para a fase adulta (Spear, 2000) e é caracterizada por alterações neuroendócrinas (Spear, 2002), bem como por mudanças causadas pela maturação do sistema nervoso (Bayer et al., 1982; Huttenlocher, 1990; McWilliams & Lynch, 1983; Rakic et al., 1994; Teicher et al., 1995). Estas alterações se somam ainda a outros eventos ocorridos nesta fase do desenvolvimento, como a maturação sexual e o aumento de altura e peso puberais. As mudanças observadas na adolescência em humanos também podem ser vistas em outras espécies de mamíferos, como roedores, que sofrem um processo de maturação neuroendócrino e comportamental semelhante (para revisão: Spear, 2000).

O período que compreende a idade em torno da adolescência é classicamente definido como periadolescência (Spear & Brake, 1983) e a duração do processo de adolescência varia consideravelmente em humanos (Dubas, 1991), compreendendo toda a segunda década de vida em humanos (Petersen et al., 1996), particularmente, o período de 12 a 18 anos de idade (Spear, 2000). Alguns autores consideram ainda uma adolescência tardia, que se estende até os 25 anos de idade (Baumrind, 1987). Em camundongos, a adolescência pode ainda ser dividida em precoce [dia pós-natal (PN) 24 a 35], média (PN 37 a 48) e tardia (PN 50 a 61) (Adriani et al., 2002).

Comportamentalmente, adolescentes de várias espécies diferem de indivíduos mais jovens e mais velhos (Spear, 2000). Roedores adolescentes exibem um aumento da busca por novidades, impulsividade e comportamento de risco (Adriani et al., 2004; Arnett, 1992; Little, 2000; Macri et al., 2002; Spear, 2000), bem como uma redução da resposta ao stress (Adriani & Laviola, 2000). Em relação a ratos em outras fases do desenvolvimento, ratos adolescentes exibem um aumento no comportamento exploratório, na busca por novos estímulos (Adriani et al., 1998; Spear et al., 1980; Spear, 2000) e um aumento da interação social e com seus pares (Spear, 2000).

Em humanos, o adolescente intensifica sua interação social fora do ambiente familiar em busca de novas experiências e referências como parte do processo de emancipação emocional e intelectual dos pais (Spear, 2002). Ademais, o adolescente humano exhibe traços comportamentais característicos, como a impulsividade, o comportamento de risco e a labilidade emocional, que, por sua vez, estão associados a uma maior suscetibilidade a

transtornos psiquiátricos, dentre eles, a adição a drogas (Andersen, 2003; Spear, 2000; Teicher et al., 2003; Volkow & Li, 2005; Wallace et al., 2003). Assim, ainda que as alterações comportamentais ocorridas na adolescência sejam indispensáveis para a aquisição de habilidades e conhecimentos necessários a sua maturação e independência (Spear, 2000), tais aspectos têm sido mostrados como um reforço problemático de condutas indesejáveis na adolescência como a experimentação de drogas de abuso (Abreu-Villaça et al., 2006; Bardo & Dwoskin, 2004; Spear, 2002, 2000; Wills et al., 1994).

1.1.1. Um período de suscetibilidade ao uso de drogas

Dados epidemiológicos têm mostrado um grande número de adolescentes consumindo bebidas alcoólicas e cigarros de tabaco. Uma pesquisa com 48 mil estudantes do ensino público fundamental e médio das 27 capitais brasileiras mostra que o álcool e o tabaco são as drogas mais usadas entre os jovens e que a defasagem escolar, a qual atinge 45,9% dos alunos entrevistados, é maior no grupo de alunos que consome drogas que no grupo que não consome (Galduróz et al., 2004).

O I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira (Laranjeira et al., 2007) mostra que 35% dos jovens com idade entre 14 e 17 anos consomem bebidas alcoólicas pelo menos uma vez por ano e 24% dos adolescentes, pelo menos uma vez por mês. Este estudo mostra ainda que a idade média para o início do uso regular de bebidas alcoólicas é cada vez mais precoce: os adolescentes entrevistados iniciaram o uso de bebidas entre 13,9 e 14,6 anos de idade, enquanto, entre os adultos, a idade variou entre 15,3 e 17,3 anos. No Brasil, o consumo de etanol na população com idade igual ou superior a 15 anos é de 3 litros per capita por ano (Pan American Health Association, 1998; OMS, 2004), um consumo superior ao de outros países em desenvolvimento (Room et al., 2002). Entre estudantes norte-americanos no ensino médio, em 2000, mais de 50% dos alunos relataram beber bebidas alcoólicas (Johnston et al., 2001).

Nas Américas, a maioria dos adolescentes com idade entre 13 e 15 anos sofre pressão para iniciar ou manter o hábito de fumar (OMS, 2002c). Dentre os atuais fumantes, 90% começaram a fumar na adolescência como experimentadores com a intenção de parar quando desejassem (SENAD, 2005). De fato, há um grande número de estudantes no ensino médio fumando cigarros de tabaco – aproximadamente, um terço nos EUA (Centers for Disease Control and Prevention, 2000).

Entre universitários brasileiros, 87,7% dos estudantes do Amazonas fazem uso de bebida alcoólica e 30,7% usaram cigarros de tabaco pelo menos uma vez na vida (Lucas, 2006). Em São Paulo, 70% dos universitários consumiram algum nível de bebida alcoólica nos últimos seis meses, sendo 75% destes consumiram no último mês e, para o consumo de cigarros, 65% dos estudantes consomem cigarros e 44% pelo menos um cigarro ao mês (Pillon et al., 2005). Este estudo mostrou ainda que o uso de cigarros de tabaco e de bebida alcoólica tinha início entre 10 e 18 anos de idade e que apenas 20% destes estudantes consideravam nocivo o uso ocasional de cigarro e apenas 17% observavam risco para o consumo de etanol.

As motivações que conduzem o jovem à experimentação de drogas de abuso são pouco conhecidas e parecem ser multifatoriais. Para muitos adolescentes, a experimentação e o uso de drogas representam um processo de autoconhecimento e de auto-afirmação por meio da transgressão à autoridade, seja ela personificada pela figura familiar ou por outra figura social (Kirchentejn & Chatkin, 2004). Assim, a observação do uso de drogas nesta fase do desenvolvimento é relevante, uma vez que o consumo de drogas, particularmente, tabaco e álcool, se inicia na adolescência (Elders et al., 1994; Johnston et al., 2001; Pierce & Gilpin, 1996).

Diversos estudos mostram que adolescentes tendem a usar mais de um tipo de droga (Elders et al., 1994; Galduróz et al., 2004; Lucas, 2006; Pillon et al., 2005). Também foi demonstrado que tabaco e álcool são as drogas preferidas entre os adolescentes (Galduróz et al., 2004), além disso, há uma forte associação entre cigarro e bebida na adolescência (Diecker et al., 2006; Schmid et al., 2007). De fato, tabaco e álcool compartilham fatores de risco para a iniciação, como fatores sociodemográficos (sexo, idade, classe social, etnia), familiares (relação pais-filhos, morar ou não com os pais, história social e estado civil dos pais) e comportamentais (Bobo & Husten, 2000; Fisher et al., 2007; Little, 2000; Tavares et al., 2004), além da pressão exercida pelo grupo social no qual o jovem está inserido contribuir significativamente para que o adolescente se torne um usuário de cigarro e/ou bebida alcoólica (Bobo & Husten, 2000; Little, 2000; Mallett et al., 2006).

Jovens cujas famílias possuem hábitos tabagistas e etilistas apresentam uma maior ocorrência do uso de cigarro e bebida (Bobo & Husten, 2000; Lucas, 2006) e aqueles adolescentes cujos familiares, amigos ou parceiros fumam aderem ao cigarro mais precocemente (Unger & Chen, 1999). Já a decisão de consumir ou não bebida alcoólica é, em parte, baseada na observação do comportamento de outros jovens sob efeito do álcool (Mallett et al., 2006). É possível que a desinibição promovida pelo álcool, que facilita a

interação social entre jovens (Hunt et al., 2001; Varlinskaya et al., 2001; Varlinskaya & Spear, 2002) também contribua para que adolescentes consumam níveis mais altos de bebida que indivíduos mais velhos.

1.1.2. Suscetibilidade neurobiológica

Além das interações sociais e o uso familiar de drogas atuarem de alguma maneira na determinação da experimentação e uso de drogas, evidências demonstram que alterações neurofisiológicas têm papel de destaque na maior suscetibilidade do adolescente. Isto porque o período de formação e desenvolvimento do sistema nervoso, iniciado no período pré-natal e estabilizado na idade adulta, se estende até a adolescência (Spear, 2000), quando ainda ocorre proliferação de neurônios, apoptose e rearranjo sináptico em diversas regiões (Altman & Bayer, 1990; Bayer, 1983; Bayer et al., 1982; Hodges et al., 1991; Hogg, 1996; Huttenlocher, 1990; McWilliams & Lynch, 1983; Spear, 2000) e um aspecto particularmente importante deste período é que a estimulação neuronal induz à reorganização sináptica (Scheetz & Constantine-Paton, 1994). Desta forma, pode-se supor que o cérebro do adolescente seja ainda mais vulnerável a efeitos deletérios da exposição a agentes externos, como drogas de abuso. Algumas destas regiões que sofrem alterações na adolescência estão associadas à impulsividade, à tomada de decisão, à motivação e ao abuso de drogas (Chambers et al., 2003).

O hipocampo, estrutura fundamental nos processos de aprendizagem e memória (Riedel & Micheau, 2001) e relacionada à resposta ao estresse (Lathe, 2001), como a interação social e a maturação sexual ocorrida no período puberal (Goldman et al., 1973; Sapolsky et al., 1985), sofre um aumento exuberante de axônios excitatórios colaterais e suas sinapses são morfológicamente modificadas com uma remodelação da arborização dendrítica como consequência da maturação ocorrida ao longo da adolescência (Swann et al., 1999). Alterações do volume do hipocampo e da amígdala são sexo-dependentes (Durston et al., 2001; Koshibu et al., 2004). As interações entre o córtex frontal e a amígdala, críticos no processamento cognitivo de informações emocionais, também continuam a se desenvolver ao longo da adolescência (Cunningham et al., 2002), quando ocorre uma maturação cortical substancial, que induz a um aumento da mielinização na substância branca e a uma remodelação da substância cinzenta (Durston et al., 2001; Gogtay et al., 2004).

O lobo frontal também sofre um crescimento importante e uma intensa remodelação na adolescência (Diamond, 1991; Spear, 2000; White & Swartzwelder, 2005). Particularmente, o volume do córtex pré-frontal, estrutura envolvida em muitas habilidades cognitivas, como planejamento e controle motor voluntário, aprendizado espacial, memória operacional, controle da impulsividade e tomada de decisão, parece diminuir tanto em humanos (Sowell et al., 1999, 2001) quanto em ratos adolescentes (Van Eden et al., 1990). Além disso, uma perda significativa de conexões glutamatérgicas no córtex pré-frontal pode ser observada em humanos e primatas não-humanos (Huttenlocher, 1984; Zecevic et al., 1989) em oposição ao aumento dos impulsos dopaminérgicos e serotoninérgicos (Kalsbeek et al., 1988; Rosenberg & Lewis, 1994), bem como de neurônios colinérgicos em ratos (Gould et al., 1991) e em humanos (Kostovic, 1990). De fato, a maturação dos sistemas neurotransmissores gabaérgico (Moy et al., 1998), glutamatérgico (McDonald et al., 1990) e, principalmente, dopaminérgico estriatal (Teicher et al., 1995) e colinérgico central (Matthews et al., 1974; Nadler et al., 1974; Zahalka et al., 1993), envolvidos nos processos de aprendizagem, memória e respostas a psicoestimulantes, são consolidadas durante a periadolescência.

Os níveis de receptores dopaminérgicos no corpo estriado aumentam durante o início da adolescência e diminuem ao final desta e na fase adulta jovem (Teicher et al., 1995). Particularmente, os níveis de dopamina no núcleo acumbens, uma região diretamente envolvida na aprendizagem e na consolidação da memória associada a um estímulo-resposta (recompensa ou punição) e a mecanismos de recompensa e adição a drogas (Blum et al., 1990), aumentam dramaticamente na adolescência. Além do papel desempenhado pela dopamina no núcleo acumbens, é provável que neurotransmissores dopaminérgicos interajam com hormônios envolvidos na resposta aos estresses sofridos no período puberal, como a maturação sexual e a interação social (Goldman et al., 1973; Sapolsky et al., 1985).

Um outro aspecto fundamental da adolescência em humanos é a dissincronia entre a idade corporal e a mental: embora a maturação dos órgãos sexuais traga uma semelhança física cada vez maior entre o adolescente e o adulto e, consigo, a iniciação da vida sexual e outras responsabilidades para as quais, muitas vezes, ainda não se sente preparado, para que um adolescente desempenhe uma tarefa com o mesmo sucesso de um adulto, seu cérebro despenderá muito mais energia e trabalho para alcançar a mesma performance de um cérebro adulto (Powell, 2006). Estudos comportamentais mostram que o desempenho de tarefas incluindo controle inibitório e tomada de decisão continuam a se desenvolver durante a adolescência (Crews et al., 2007). Em resumo, a plasticidade neural é a base

neurobiológica de adaptação ao ambiente e o que conduz o indivíduo a comportamentos mais maduros, como os de um adulto (Crews et al., 2007).

1.2. Tabaco

Uma das primeiras notícias da existência do tabaco veio da América, onde era costume dos nativos fumá-lo nas cerimônias religiosas. A planta e suas sementes foram levadas à Corte espanhola pelo Capitão Don Rodrigues de Jeres, membro da tripulação de Cristóvão Colombo. Em 1526, houve a primeira referência impressa em História Natural de las Índias, de Don Gonzalo Fernandes. O tabaco espalhou-se pela Europa muito rapidamente, a tal ponto que, cinqüenta anos após sua chegada, quase todo continente consumia tabaco (Rosemberg, 2004).

Inicialmente, o tabaco era consumido em cachimbos, passando para o uso de charutos leves, até que, em meados do século XIX, houve o surgimento do cigarro, que se expandiu no mercado por ser mais econômico, mais cômodo de carregar e usar que o charuto e o cachimbo. A primeira grande expansão mundial foi após a Primeira Guerra Mundial, sendo praticamente no sexo masculino. Entre as mulheres, sua difusão cresceu após a Segunda Guerra Mundial (Rosemberg, 2004).

Embora a prevalência do consumo de tabaco venha diminuindo em países desenvolvidos, o mesmo não acontece em países em desenvolvimento, nos quais vivem 80% dos fumantes (Rosemberg, 2004). O marketing agressivo e as regulamentações permissivas, com tarifas mais leves, favorecem o incremento das indústrias de tabaco em países mais pobres (Bartecchi et al., 1995). O fato de a população não ser suficientemente informada quanto aos malefícios do cigarro também contribui para uma maior prevalência de fumantes nestes países. De acordo com o Relatório Mundial da Saúde (OMS, 2002b), no Brasil, adultos com baixa ou sem escolaridade têm cinco vezes mais chances de fumar que aqueles que atingiram o Ensino Médio.

A universalização do tabaco se deve ao poder aditivo da nicotina, sua principal substância psicoativa: aproximadamente, $\frac{3}{4}$ dos adolescentes que experimentam fumo se tornarão fumantes diários (Centers for Disease Control and Prevention, 1998; National Institute on Drug Abuse, 1998; Nelson et al., 1995). Dentre os fumantes, 80% desejam parar de fumar, mas, ao ano, apenas 35% tentam e menos que 5% obtêm sucesso ao longo de inúmeras tentativas (American Psychiatric Association, 1994). Anualmente, um bilhão e

trezentos milhões de tabagistas consomem sete trilhões e trezentos milhões de cigarros de tabaco, num total de setenta e três mil toneladas de nicotina (Rosemberg, 2004).

Além da nicotina, os cigarros de tabaco contêm cerca de 4.500 substâncias químicas – algumas cancerígenas e outras tóxicas (Rosemberg, 2004). Desta forma, o cigarro de tabaco ainda predispõe o fumante a um grande número de doenças, como: cânceres (pulmão, esôfago, boca, bexiga, rim); doenças respiratórias (doença pulmonar obstrutiva crônica e enfisema); doenças cardiovasculares (doença arterial coronariana; acidente vascular encefálico; infarto agudo do miocárdio, doença arterial periférica); entre outras (Fagerström, 2002; Nunes, 2006).

Infelizmente, os riscos de adoecimento e conseqüente morte não se restringem ao tabagista. O fumante passivo, ou seja, o não-fumante exposto à fumaça do cigarro, quando comparado ao indivíduo não exposto, tem 30% mais chances de desenvolver câncer (Ministério da Saúde, 2007). A OMS mostrou que, em 2002, o total de mortes prematuras atribuídas ao tabagismo chegou a cinco milhões, com perspectivas de dez milhões de óbitos para o ano 2020. O tabagismo é responsável por 2,6% da mortalidade geral mundial, podendo chegar a 8,9% em 2020. No Brasil, morrem 200 mil pessoas ao ano pelo uso do tabaco (Rosemberg, 2004). Assim, o tabagismo é o maior agente isolado de morbidade e mortalidade no mundo.

1.2.1. Mecanismos neurofisiológicos de ação da nicotina

Presente nas folhas do tabaco (Rosemberg, 2004), a nicotina é um alcalóide natural de fórmula molecular $C_{10}H_{14}N_2$ (Da Silva, 2004) primariamente responsável pelos efeitos comportamentais (Jacobsen et al., 2005, 2007; Levin et al., 2005; McGehee, 2007) e pela adição do cigarro (Dani et al., 2001; Kirchentejn & Chatkin, 2004; Rosemberg, 2004).

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

doses de nicotina administradas via adesivo transdérmico e pastilha mastigável em fumantes de mais de 20 cigarros/dia mostra que, com a terapia substitutiva, o nível de nicotina na saliva é sempre inferior ao alcançado através do fumo (Leischow et al., 1997).

A inalação é a via mais rápida de absorção da nicotina quando comparada à administração via oral (em forma de goma de mascar ou pastilhas) ou transdérmica (Guerra, 2004), isto porque a absorção da nicotina é pH-dependente (Svensson, 1987): a fumaça do cigarro disponibiliza a nicotina em sua forma ácida, o que promove uma maior absorção nos alvéolos pulmonares enquanto a nicotina via oral se encontra em sua forma alcalina e é rapidamente absorvida pela mucosa oral (Galvão & Moreau, 2003; Tutka et al., 2005). O metabólito principal da nicotina é a cotinina (Galvão & Moreau, 2003; Tutka et al., 2005).

A nicotina é um estimulante leve do sistema nervoso central (SNC) que, quando consumida nas primeiras vezes, promove tontura, formigamento e alterações de humor. Estes sintomas são progressivamente menos percebidos à medida que aumenta a frequência do uso do cigarro, o que constitui o quadro de tolerância à droga (Rosemberg, 2004). Baixas concentrações plasmáticas de nicotina desencadeiam sintomas de retirada da droga, entre eles diminuição da concentração (Jacobsen et al., 2005), irritabilidade, ansiedade, disforia ou depressão e aumento do apetite (Goodman & Gilman, 2006), que levam o fumante a buscá-la novamente para evitar ou cessar tais sintomas.

A ação central da nicotina se deve à sua rápida difusão pela barreira hematoencefálica e, principalmente, pela sua afinidade específica com os receptores colinérgicos nicotínicos centrais (nAChRs) (Buisson & Bertrand, 2001; Domino, 1998; Wang & Sun, 2005), dada sua semelhança estrutural à acetilcolina (Balfour, 1982). Desta forma, os receptores nicotínicos atuam como mediadores primários dos efeitos desta droga no cérebro (Falk et al., 2006; Wonnacott, 1997).

Os nAChRs, localizados nas camadas I, III, e IV do córtex cerebral, cerebelo, na maioria dos núcleos talâmicos, em algumas estruturas mesencefálicas (área do tegumento ventral, núcleo interpeduncular, colículo superior, substância negra compacta), hipocampo e outras regiões (Domino, 1998; Wang & Sun, 2005), são canais pentaméricos catiônicos ligantes distribuídos em sítios pré e pós-sinápticos no sistema nervoso central e periférico (Leonard e Bertrand, 2001; Sargent, 2000; Wonnacott, 1997) e desempenham um importante papel no desenvolvimento neuronal, na atividade motora e nas vias envolvidas em aprendizagem e memória (Jacobsen et al., 2005; McGehee, 2007; Wang & Sun, 2005). Em mamíferos, já foram clonadas 8 subunidades α ($\alpha 2$ a $\alpha 7$, $\alpha 9$ e $\alpha 10$) e 3 subunidades β

($\beta 2$ a $\beta 4$) (El Goyhen et al., 1994, 2001; Lindstrom et al., 1996; McGehee & Role, 1995; Sargent, 1993; Tassonyi et al., 2002).

A ativação prolongada ou repetida dos nAChRs por agonistas, como a nicotina, provoca uma diminuição ou perda da resposta biológica através de uma rápida inativação temporária destes canais, ao que chamamos dessensibilização (Dani, 2001; Davis & De Fiebre, 2006; Wang & Sun, 2005), particularmente, a dessensibilização do receptor $\alpha 4\beta 2$ (Brody et al., 2006). Como uma resposta celular a dessensibilização (Fenster et al., 1999), há um aumento do número e/ou da afinidade de nAChRs na membrana sináptica, fenômeno chamado *upregulation* ou suprarregulação (Buisson & Bertrand, 2001; Wang & Sun, 2005).

A dessensibilização e a suprarregulação podem ser observadas tanto num curto período de exposição à droga (Abreu-Villaça et al., 2003a) quanto, claramente, na exposição crônica à nicotina (Buisson & Bertrand, 2001; Wang & Sun, 2005). Desta forma, foi proposto que a dessensibilização e a suprarregulação dos nAChRs devidas à exposição à nicotina sejam a base neurobiológica do desenvolvimento da tolerância à droga por fumantes e que também influencie na produção dos sintomas de retirada no período de abstinência da nicotina (Balfour & Fagerstrom, 1996; Dani & Heinemann, 1996; Nishizaki & Sumikawa, 1998; Nojima et al., 2000).

A ativação dos nAChRs também exerce um papel importante na resposta de recompensa induzida pelo uso da nicotina e, conseqüentemente, na adição à droga (Dani et al., 2001; Wang & Sun, 2005): a ativação dos nAChRs medeia uma liberação adicional de dopamina estriatal (Wonnacott et al., 2000; Zhou et al., 2001) e na área do tegumento ventral (Dani & De Biasi, 2001; Lajtha, 2008), uma área crucial nos mecanismos de adição à droga. O uso da nicotina promove ainda um aumento da liberação de dopamina no córtex pré-frontal (Tsukada et al., 2005). Desta maneira, a nicotina induz o aumento dos níveis de dopamina em áreas diretamente envolvidas com mecanismos de recompensa e reforço (Lebargy, 2003).

1.3. Álcool

O álcool faz parte da história da humanidade e sua importância cultural e social não pode ser ignorada: o etanol é a substância psicoativa mais utilizada pela sociedade. Existem relatos da utilização de bebida alcoólica nas populações do antigo Oriente Médio, 4.000 anos antes de Cristo. Na Idade Média, as bebidas destiladas, com uma maior

concentração de álcool, tiveram sua produção intensificada (Bau, 2002). Em alguns países europeus, o consumo do álcool incorporou-se aos hábitos de vida diária como, por exemplo, durante as refeições (Bloomfield et al., 2003). Atualmente, estima-se que mais de dois terços da população ocidental bebam mais do que ocasionalmente (Bau, 2002).

Nos Estados Unidos da América, mais de 90% dos adultos relatam experiência com bebidas alcoólicas e aproximadamente 70% relatam algum nível de uso no momento (Kaplan et al., 1994). Cerca de 15% dos indivíduos preenche critérios diagnósticos para o abuso do álcool e 3-5% das mulheres e 10% dos homens preenchem critérios para dependência ao longo da vida (Kaplan et al., 1994). A Organização Mundial de Saúde (2004) revela que o consumo desta droga no Brasil cresceu 154,8% em 3 décadas sendo que 16 milhões de pessoas são dependentes do álcool (Secretaria Nacional Antidrogas, 2004).

O consumo abusivo do álcool também tem sido apontado com uma grande causa de perdas econômicas à sociedade devido à diminuição da atividade no trabalho e da produtividade, custos com serviços de saúde, serviços sociais e justiça penal (Bau, 2002; OMS, 2002a). Além do quadro de dependência, o abuso de bebidas alcoólicas traz consigo outra problemática: no Brasil, o consumo de álcool é responsável por 40% dos acidentes nas empresas (Quaglia, 2004) e a terceira causa de absenteísmo no trabalho (Nascimento, 2004). Dados do IML – SP (1999) mostram que 50% dos acidentes automobilísticos fatais estão associados ao uso de bebidas alcoólicas. Além disso, o uso concomitante de etanol e de outras drogas psicoativas é responsável por 20% das internações hospitalares por distúrbios mentais (Pan American Health Organization, 1998). Desta forma, os problemas relacionados ao uso do álcool tornaram-se socialmente relevantes nos últimos séculos.

Alguns dos sintomas do uso de bebida alcoólica podem ser sentidos agudamente e variam a intensidade de acordo com a dose ingerida. Em baixas doses, a bebida leva o indivíduo a um estado de euforia. À medida que a concentração de álcool no sangue se eleva, o bebedor passa por estágios iniciais de depressão do sistema nervoso central (SNC), como sonolência, confusão mental, desorientação, enquanto estágios mais graves de intoxicação pelo álcool, podem culminar com a morte, como pode ser visto no Quadro 1 a seguir.

Cronicamente, o uso nocivo do álcool pode levar a doenças graves como a síndrome de Wernicke-Korsakoff, na qual, além de alterações cerebelares, o paciente cursa com amnésia; polineuropatia alcoólica; gastrites e úlceras; hepatites tóxicas e cirrose; pancreatite; miocardites, predisposição à aterosclerose, com risco de infarto e acidente

vascular cerebral; aumento do risco de neoplasias no trato gastrointestinal, bexiga, próstata e em outros órgãos (Bau, 2002).

Quadro 1 – Estágios da intoxicação pelo álcool

BAC (g/100 mL de sangue ou g/210 L de ar respirado)	Estágio	Sintomas clínicos
0.01 - 0.05	Subclínico	Comportamento normal
0.03 - 0.12	Euforia	Euforia leve, sociabilidade, indivíduo torna-se mais falante. Aumento da autoconfiança, desinibição, diminuição da atenção, Capacidade de julgamento e controle. Início do prejuízo sensório-motor Diminuição da habilidade de desenvolver testes
0.09 - 0.25	Excitação	Instabilidade e prejuízo do julgamento e da crítica Prejuízo da percepção, memória e compreensão Diminuição da resposta sensitiva e retardo da resposta reativa Diminuição da acuidade visual e visão periférica Incoordenação sensitivo-motora, prejuízo do equilíbrio Sonolência
0.18 - 0.30	Confusão	Desorientação, confusão mental e adormecimento Estados emocionais exagerados Prejuízo da visão e da percepção da cor, forma, mobilidade e dimensões Aumento da sensação de dor Incoordenação motora Piora da incoordenação motora, fala arrastada Apatia e letargia
0.25 - 0.40	Estupor	Inércia generalizada Prejuízo das funções motoras Diminuição importante da resposta aos estímulos Importante incoordenação motora Incapacidade de deambular ou coordenar os movimentos Vômitos e incontinência prejuízo da consciência, sonolência ou estupor
0.35 - 0.50	Coma	Inconsciência Reflexos diminuídos ou abolidos Temperatura corporal abaixo do normal Incontinência Prejuízo da respiração e circulação sanguínea Possibilidade de morte
0.45 +	Morte	Morte por bloqueio respiratório central

FONTE: <http://www.alcoolismo.com.br/efeitos.html>

A OMS (2005) atribui ao álcool 4% da taxa de morbidade acarretando em 2 milhões de mortes ao ano, um total de 3,2% da mortalidade mundial. O consumo de bebidas alcoólicas é apontado como a 3ª causa de mortalidade em países desenvolvidos (OMS, 2005).

1.3.1. Mecanismos neurofisiológicos de ação do etanol

O álcool de fórmula molecular $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (etanol) é uma substância hidrossolúvel e tal propriedade permite uma rápida difusão pela barreira hematoencefálica (Goodman & Gilman, 2006; Scivoletto & Malbergier, 2003). O pico plasmático da droga varia em função da dose de etanol ingerida, do sexo, peso e idade do indivíduo que a consome (SENAD, 2005). Além destas particularidades, as variações na taxa de absorção do etanol dependem, também, do tempo de esvaziamento gástrico e do início da absorção intestinal (Lieber, 2000; Scivoletto & Malbergier, 2003). Entretanto, a ingestão oral do etanol leva a menores concentrações plasmáticas da droga do que se a mesma quantidade fosse administrada por infusão intravenosa devido a metabolização primária do etanol ocorrer no estômago e, posteriormente, no intestino delgado e no fígado (Lieber, 2000).

O etanol é convertido em acetaldeído, metabólito primário do álcool, e, por sua vez, em ácido acético pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase respectivamente (Bau, 2002). Há controvérsias com relação aos efeitos farmacológicos e comportamentais do acetaldeído, sendo ora apresentado como um modulador dos efeitos do álcool ora como o protagonista destes efeitos, em especial, os de recompensa e adição à droga (Quertemont, 2004; Quertemont & Didone, 2005). Entretanto, sua propriedade tóxica é conhecida, uma vez que um aumento no nível sérico de acetaldeído provoca uma reação desagradável que inclui náusea, cefaléia, vasodilatação periférica e taquicardia (Bau, 2002).

Embora a bebida alcoólica seja comumente utilizada como um estimulante por promover a desinibição e, em baixas doses, conduzir o indivíduo a um estado de euforia (ver Quadro 1, p. 10), o etanol é um depressor do SNC, que atua como sedativo e ansiolítico (Goodman & Gilman, 2006). As sensações prazerosas atribuídas ao uso do etanol atuam como um reforço positivo, uma recompensa, e o desejo de reproduzi-las conduzem o indivíduo a novas experiências com o álcool.

Os efeitos centrais do etanol se devem à alteração seletiva e específica de várias proteínas ligadas à membrana que afetam o funcionamento de canais iônicos, enzimas e vários sistemas neurotransmissores (Gonzales & Hoffman, 1991; Samson & Harris, 1992; Scivoletto & Malbergier, 2003; Zaleski et al., 2004). Um dos principais mecanismos neuroquímicos de recompensa do etanol e que pode culminar na adição desta droga se dá pelo aumento na liberação de dopamina no núcleo acumbens (Di Chiara et al., 2004; Diana et al., 1992; Kianmaa & Tabakoff, 1983). Demais achados ainda enfatizam os sistemas

neurotransmissores serotoninérgicos e opióides (Oroszi & Goldman, 2004), receptores glutamatérgicos (Gerdeman et al., 2003), subunidades de receptores GABA e receptores colinérgicos (Edenberg & Kranzler, 2005) como mediadores dos efeitos de reforço do etanol (Edenberg & Kranzler, 2005; Larsson & Engel, 2004; Oroszi & Goldman, 2004) e reguladores da sensibilização ao álcool (Moore et al., 1998).

O receptor do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico) é um dos principais sítios de ação do etanol. O sistema gabaérgico, principal sistema neurotransmissor inibitório do SNC (Yogeeswari et al., 2006), é um modulador da liberação de dopamina no sistema mesocorticolímbico (Eiler & June, 2007) e, diretamente envolvido nos processos de ansiedade, atua como mediador dos efeitos de sedação do etanol (Goodman & Gilman, 2006; Mihic & Harris, 1997). O aumento da ativação gabaérgica ocorrida durante a adolescência é um fator que colabora para o desenvolvimento da tolerância e da adição ao etanol nesta fase do desenvolvimento (Li et al., 2003; Mihic and Harris 1997; Silveri & Spear, 2002).

O sistema receptor glutamatérgico NMDA (N-Metil-D-Aspartato), um receptor ionotrópico que medeia a neurotransmissão excitatória no SNC e desempenha um papel central no desenvolvimento neuronal, na formação da memória e algumas formas de plasticidade sináptica, é outro importante sítio de ação do etanol (Quiang et al., 2007). A exposição aguda ao etanol deprime a ativação dos receptores NMDA e o influxo de Ca^{2+} em várias regiões cerebrais (Hoffman et al., 1989; Lovinger et al., 1989). Para compensar esta inibição, há um aumento da densidade de receptores (Grant et al., 1990; Gulya et al., 1991) e uma elevação da expressão do RNAm e das subunidades dos receptores NMDA no SNC (Bao et al., 2001; Chandler et al., 1999; Follesa & Ticku, 1995, 1996; Kalluri et al., 1998) como resultado da exposição crônica ao etanol. Como consequência, a retirada da exposição crônica à droga leva a uma alteração da resposta excitatória mediada pelo NMDA (Carpenter-Hyland et al., 2004; Thomas & Morrisett, 2000). Funcionalmente, esta inibição excitatória glutamatérgica repercute em alterações de memória (Tsai & Coyle, 1998) e sintomas de retirada da droga (Koob et al., 1998).

Semelhante ao que se dá em humanos, baixos níveis do metabólito final da serotonina estão associados a um comportamento agressivo e impulsivo e à tolerância aos efeitos do álcool numa exposição inicial em macacos, o que aumentaria a capacidade de ingerir álcool (Higley et al., 1996). A identificação de genes que afetam o risco para a adição de álcool foi feita em macacos rhesus fêmeas adolescentes, cuja suscetibilidade à

adição do álcool é ainda maior uma vez que o cromossomo X possui um gene que interfere na concentração sináptica de serotonina (Samochowiec et al., 1999).

Os efeitos do etanol também podem ser observados no sistema colinérgico nicotínico ao produzir um aumento dose-dependente dos níveis de colinesterase – enzima que degrada acetilcolina (Çelik et al., 2005). Devido à maior degradação, há uma redução dos níveis de acetilcolina tanto em humanos quanto em ratos (Sasaki et al., 1995) o que leva a um aumento da função de vários subtipos de nAChRs, como os $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 2\beta 2$ e $\alpha 2\beta 4$, pela suprarregulação destes receptores (Cardoso et al., 1999), e uma inibição do subtipo $\alpha 7$ (Cardoso et al., 1999; De Fiebre & De Fiebre, 2005; Yu et al., 1996). Uma vez que os nAChRs regulam a liberação de GABA, NMDA e dopamina (Aramakis & Metherate, 1998; Chiodini et al., 1999; Levin & Simon, 1998; Miledi, 1980; Wonnacott, 1997; Yin & French, 2000), a modulação dos nAChRs causada pelo etanol pode modificar a liberação sináptica e a função destes sistemas neurotransmissores.

1.4. O co-abuso

Segundo a American Psychiatric Association (1994), nicotina e etanol atuam como drogas de abuso ou aditivas quando administradas a despeito do conjunto de sintomas que desencadeiam. E ainda que muitas evidências mostrem que o tabagismo (Fagerström, 2002; Nunes, 2006; Rosemberg, 2004) e o etilismo (Bau, 2002; Kaplan et al., 1994; Pan American Health Organization, 1998) são um grave problema na saúde pública mundial, tabaco e álcool são drogas aceitas pela sociedade, consumidas licitamente e largamente abusadas e a frequência do uso de uma das drogas está diretamente relacionada à frequência da outra (Bobo & Husten, 2000). De fato, a co-ocorrência do fumo de tabaco e do consumo de bebidas alcoólicas é freqüente e bem documentada.

Fumantes bebem duas vezes mais do que os não-fumantes (Carmody et al., 1985) e a presença de alcoolismo entre fumantes é dez vezes maior que em não-fumantes (Dawson, 2000; DiFranza & Guerrerá, 1990). De fato, 30% dos fumantes são alcoólicos (Larsson & Engel, 2004). Há, também, uma maior incidência de fumantes entre os alcoólicos (Rezvani & Levin, 2002) de tal forma que cerca de 90% dos alcoólicos fumam (Burling & Ziff, 1988; Dreher & Fraser, 1967), além de consumirem mais cigarros por dia em comparação aos não-alcoólicos fumantes (Dawson, 2000).

Resultados recentes mostram que a iniciação precoce do consumo de cigarros e bebidas alcoólicas prediz fortemente a dependência química ao longo do tempo (Chen &

Millar, 1998; National Institute on Drug Abuse, 1998; Grant, 1998). Metade dos jovens fumantes deseja parar de fumar, mas não obtém sucesso (OMS, 2002c) e, infelizmente, a prevalência da dependência do álcool entre jovens têm aumentado (Chatterji et al., 1997). Além disso, o consumo de nicotina e etanol na adolescência aumenta o risco de se desenvolver transtornos relacionados ao uso destas drogas (Fisher et al., 2007; Schmid et al., 2007) como doenças afetivas e adição de drogas (Andersen, 2003; Arnett, 1999; Spear, 2000; Teicher et al., 2003; Volkow & Li, 2005; Wallace et al., 2003) e traz conseqüências funcionais ainda durante a adolescência, dentre elas, alterações cognitivas (Jacobsen et al., 2005, 2007, Santucci et al., 2004; Tapert et al., 2005; White, 2003).

A prevalência do consumo de álcool em adolescentes fumantes é dez vezes maior do que em adolescentes que nunca fumaram (58,1% versus 5,6%) e a ocorrência de fumantes entre adolescentes que bebem é cinco vezes maior comparada a adolescentes que não beberam nos últimos 30 dias (76,8% versus 14,1%) (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 1998). Por sua vez, adolescentes que usam tabaco e álcool podem ser distinguidos daqueles que somente usam álcool, pois os que praticam o co-abuso procuram mais novidades e têm expectativas mais positivas em relação ao uso da bebida alcoólica (Schmid et al., 2007). O fato de a co-ocorrência de fumar e beber entre adolescentes ser maior nos finais de semana, quando os adolescentes estabelecem uma maior interação social (Mallett et al., 2006), torna claro o quanto as relações sociais também contribuem significativamente para o co-abuso de tabaco e álcool na adolescência (Diecker et al., 2006).

As sensações de prazer decorrentes do consumo e que podem implicar na adição de drogas, são, fundamentalmente, promovidas pela via dopaminérgica mesocorticolímbica (Berke & Hyman, 2000; Di Chiara et al., 2004; Everitt & Wolf, 2002; Hyman & Malenka, 2001; Koob & Le Moal, 2001). Os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos, que se originam na área do tegumento ventral mesencefálica e na substância negra compacta e se projetam para o corpo estriado, núcleo acumbens e outras estruturas do sistema límbico, atuam como mediadores do mecanismo de recompensa e reforço pelo uso de drogas (Wise, 2004). A adição é cada vez mais encarada como um processo patológico de aprendizagem, envolvendo sinalização celular e mecanismos sinápticos semelhantes aos envolvidos nos modelos neurais de aprendizagem e memória (Berke & Hyman, 2000; Hyman & Malenka, 2001; Nestler, 2001).

Como visto anteriormente, o aumento na liberação de dopamina em áreas relacionadas aos mecanismos de recompensa, reforço e adição ocorre tanto pela

administração de nicotina (Dani & De Biasi, 2001; Lajtha, 2008; Lebargy, 2003) quanto de etanol (Di Chiara et al., 2004; Diana et al., 1992; Kianmaa & Tabakoff, 1983) isoladamente. Nestas considerações, uma liberação adicional da dopamina no núcleo acumbens tem sido mostrada em decorrência da dupla exposição à nicotina e ao etanol (Inoue et al., 2007; Tizabi, 2002).

Estes dados sugerem que a exposição concomitante aumenta os efeitos de recompensa observados quando cada uma das drogas é administrada separadamente, o que, a seu turno, poderia contribuir para a alta incidência do co-uso e do co-abuso de cigarros de tabaco e bebida alcoólica. Estes dados sugerem ainda que nicotina e etanol interagem a ponto de uma droga poder modificar o comportamento ou os efeitos bioquímicos da outra. Além disso, é provável que a interação de neurotransmissores dopaminérgicos com hormônios envolvidos na resposta aos estresses sofridos no período puberal, como a maturação sexual e a interação social (Goldman et al., 1973; Sapolsky et al., 1985), também contribuam para o consumo de drogas de abuso na adolescência (Spear, 2000; Tschann et al., 1994).

Os mecanismos de interação central de nicotina e etanol ainda não foram completamente esclarecidos. Uma possível interação entre estas drogas pode ser mediada pelo acetaldeído, substância resultante do metabolismo primário do etanol (Bau, 2002) também encontrada na fumaça do cigarro pela queima da celulose (Seeman et al., 2002). Provavelmente, pelo fato de o acetaldeído estimular a via dopaminérgica mesocorticolímbica (Foddai et al., 2004), uma vez que já foi demonstrado que o acetaldeído aumenta a auto-administração da nicotina (Belluzi et al., 2005; Talhout et al., 2007) e medeia as propriedades de reforço do etanol (Quertemont et al., 2005).

Além de nicotina e etanol compartilharem mecanismos de adição pela liberação adicional de dopamina no núcleo acumbens (Di Chiara et al., 2004; Inoue et al., 2007; Tizabi, 2002; Wonnacott et al., 2000; Zhou et al., 2001), um dos lugares mais prováveis para a interação neurofisiológica de nicotina e etanol são os nAChRs (Davis & De Fiebre, 2006), uma vez que ambas as drogas têm como alvo estes receptores de membrana (Buisson & Bertrand, 2001; Cardoso et al., 1999; De Fiebre & De Fiebre, 2005; Domino, 1998; Sasaki et al., 1995; Wang & Sun, 2005). Desta maneira, supõe-se que a forte associação entre o fumo de tabaco e o consumo de bebidas alcoólicas não se restrinja a fatores de risco sócio-demográficos ou comportamentais (Bobo & Husten, 2000; Fisher et al., 2007; Little, 2000; Tavares et al., 2004), mas também a ações farmacológicas comuns a nicotina e etanol (Little, 2000).

1.5. Efeitos da nicotina e do etanol em memória/aprendizado

Entende-se por “Aprendizagem” o processo pelo qual adquirimos conhecimento sobre o mundo, bem como habilidades necessárias à sobrevivência (Kandel, 2000). Dentre tais habilidades, podemos citar as motoras, que possibilitam o desenvolvimento psicomotor e social, independência e autonomia sobre o próprio corpo, e as linguagens, imprescindíveis à transmissão do conhecimento através das gerações.

Memória é a “faculdade de reter idéias, impressões e conhecimentos adquiridos” (Ferreira, 2006), “uma dinâmica propriedade do cérebro como um todo, em vez de uma característica de uma única região específica, que reside simultaneamente em todos os lugares e em nenhuma parte no cérebro” (Basar, 2004 apud Rose, 1997). Neurofisiologicamente, por memória, entende-se o processo pelo qual o conhecimento e as habilidades são codificados, consolidados, registrados e, posteriormente, recuperados, ou seja, aprendidos (Kandel, 2000). Os tipos de memória podem ser classificados levando em consideração o como a informação é armazenada e reutilizada, sendo elas “Implícita (não-declarativa)” ou “Explícita (declarativa)”, cada uma apresentando subdivisões, e o tempo em que tais informações ficam disponíveis para a reutilização, podendo ser de “Curto-prazo”/“Recente” ou de “Longo-prazo” (Kandel, 2000).

Anatomicamente, a aprendizagem e a memória estão associadas à integração de estruturas neurais, como córtices cerebrais, estruturas hipocampais, amígdala, hipotálamo, estruturas mesencefálicas, entre outras, cada qual especializada em um ou mais tipos de memória. Esta interrelação é fundamental para os processos de aquisição, consolidação e recuperação do comportamento aprendido/memorizado. Por sua vez, esta integração é mediada por neurotransmissores, dentre os quais destacamos os sistemas dopaminérgicos, glutamatérgicos NMDA e colinérgicos nicotínicos.

Dentre as diversas regiões cerebrais envolvidas com os processos de aprendizado e memória, destacam-se o hipocampo e o complexo amigdalóide. O hipocampo é crucial nas funções cognitivas (Riedel & Micheau, 2001), destacando-se na formação da memória recente uma vez que atua como estação temporária das informações (Kandel, 2000). Isto porque os processos de aprendizagem e formação da memória mediados pelo hipocampo dependem, ao menos em parte, da neurogênese hipocampal (Baydas et al., 2005). Os hemisférios hipocampais têm ainda uma especialização funcional: o hemisfério direito está relacionado ao reconhecimento de objetos, representação espacial, enquanto o esquerdo lida com a memória para palavras, objetos e pessoas (Kandel, 2000). As projeções

hipocampais para o neocórtex são essenciais para a consolidação das formas de memória hipocampo-dependentes, relacionadas a associações ligadas ao contexto (Jaffard et al., 2001). O complexo amígdaloide desempenha um papel crucial na consolidação da memória baseada na emoção, independente de esta memória ser hipocampo-dependente ou não, adquiridas por associações simples, como por uma pista auditiva ou um choque (Jaffard et al., 2001).

Comparativamente, lesões na amígdala (Phillips & Ledoux, 1992) causam déficits no aprendizado pelo contexto e por pistas enquanto lesões hipocampais afetam o aprendizado pelo contexto, mas não por pistas associativas (Gulick & Gould, 2007; Phillips & Ledoux, 1992). Na verdade, pode ser observada uma interrelação funcional entre hipocampo e amígdala: em situações de estresse, o complexo amígdaloide modula a plasticidade hipocampal durante o processamento das informações e atribui um significado (positivo ou negativo) às novas experiências (McGaugh, 2000). Desta forma, a comunicação amígdala-hipocampo seria importante para a evocação e a expressão de memórias relacionadas ao medo (Seindenbecher, 2003).

Diretamente envolvidos nos processos de aprendizado e memória (Ferreira & Morato, 1997), é provável que esta integração amígdala-hipocampo seja mediada por receptores NMDA (NMDAR), uma vez que os NMDAR estão associados não só à memória amígdala-dependente, como o condicionamento pelo medo (Bertotto et al., 2006), mas também ao hipocampo, visto que eventos estressores promovem um aumento da liberação de glutamato no hipocampo (Moghaddam, 1993).

A aquisição do comportamento que relaciona um estímulo a uma resposta (recompensa ou punição) é tida como dependente de receptores dopaminérgicos localizados no núcleo estriado dorsal (Mishkin et al., 1984; Packard & Knowton, 2002) e no hipocampo dorsal (Rezayof et al., 2007). Além de seu envolvimento nos mecanismos de recompensa por adição de drogas, o núcleo acumbens também participa dos processos de aprendizado do tipo estímulo-resposta (Di Chiara et al., 1997). Foi demonstrado que, não somente as sensações de prazer, mas, igualmente, a exposição a estímulos aversivos (Adinoff, 2004), como uma estimulação dolorosa, aumenta a liberação de dopamina neste núcleo (Marinelli et al., 2005). Desta forma, é possível que haja uma interrelação entre a aquisição do tipo estímulo-resposta, mediada pelo sistema dopaminérgico, e a modulação amígdala-hipocampo, mediada pelos NMDAR, uma vez os valores emocionais atribuídos a uma recompensa ou uma punição possam, de alguma forma, contribuir para a consolidação deste tipo de memória.

Difusamente distribuídos no SNC, os nAChRs também estão intrinsecamente envolvidos nos processos de memória. Isto pode ser claramente observado nos quadros de demência e/ou de disfunções cognitivas, onde ocorre o declínio da transmissão colinérgica (Dani, 2001; Newhouse et al., 2004). Entretanto, os níveis de ativação colinérgica influenciam direta e indiretamente nos processos de memória/aprendizado uma vez que a ativação dos nAChRs afeta a função de outros sistemas neurotransmissores (Abreu-Villaça et al., 2003b; Dani & De Biasi, 2001; Trauth et al., 2001; Wonnacott et al., 2000), incluindo a liberação sináptica de dopamina e NMDA (Aramakis & Metherate, 1998; Chiodini et al., 1999; Levin & Simon, 1998; Miledi, 1980; Wonnacott, 1997; Yin & French, 2000).

Para que a expressão comportamental da memória/aprendizado ocorra em sua plenitude, é necessário que as estruturas e os mediadores envolvidos nestes processos não sofram “perturbações” durante o desenvolvimento até que atinjam a maturidade. De fato, o sistema nervoso em desenvolvimento é mais vulnerável a danos que o sistema nervoso do adulto. Os processos de desenvolvimento são limitados pelo tempo: janelas para experiências específicas que conduzem ao desenvolvimento são abertas somente em períodos críticos de plasticidade ou de aprendizagem (Munakata et al., 2004). O período de formação do cérebro é mais longo que o de outros órgãos e continua até a adolescência, quando diversas estruturas relacionadas à aprendizagem e à memória estão em franco desenvolvimento (Diamond, 1991; Spear, 2000; Swann et al., 1999; Sowell et al., 1999, 2001; White & Swartzwelder, 2005). Assim, pode-se supor que o cérebro do adolescente ainda é vulnerável a efeitos deletérios da exposição a agentes externos. Um estudo recente estima que cerca de 12 milhões de crianças apresentam problemas de aprendizado, desenvolvimento do sistema nervoso ou alterações comportamentais somente nos Estados Unidos, sendo que os custos com tratamentos devido à exposição a agentes ambientais é superior a 50 bilhões de dólares (Landrigan et al., 2002). Neste aspecto, o desenvolvimento de estudos em modelos animais de exposição a drogas de abuso, como nicotina e etanol, durante a adolescência tem sido fundamentais na investigação e conseqüente esclarecimento destas questões (Barron et al., 2005).

No que diz respeito à nicotina, estudos que descrevem seus efeitos cognitivos são inconsistentes. Por exemplo, em roedores adolescentes, foram mostradas melhorias mínimas na memória durante a administração de nicotina, mas que se intensificaram no período pós-tratamento (Trauth et al., 2000). Inversamente, foi demonstrado que adolescentes humanos que fumam tabaco diariamente experimentam deficiências agudas

nas memórias verbal e operacional durante o fumo ad libitum e durante a retirada (Jacobsen et al., 2005). Tsukada et al. (2005) mostraram que a administração crônica de nicotina aumenta a liberação de dopamina no córtex pré-frontal de macacos rhesus adultos e promovem uma pior performance da memória operacional. Além disso, os sintomas de retirada da nicotina em adolescentes são piores que em adultos (Elders et al., 1994).

De maneira semelhante, os efeitos do etanol na cognição de adolescentes também são controversos e parecem ser altamente dependentes das tarefas que avaliavam a performance cognitiva. Por exemplo, o consumo de etanol em ratos adolescentes causa danos à memória durante a exposição e a retirada no teste do labirinto aquático de Morris (Sircar & Sircar, 2005; White, 2005), enquanto não parece ser afetada durante o período de retirada no teste da esQUIVA passiva (Popovic et al., 2004). Em todo o caso, foi mostrado que indivíduos que iniciam a utilização de etanol durante a adolescência têm um maior risco de apresentarem déficits cognitivos (Zeigler et al., 2005). O etanol atua em subunidades do receptor glutamatérgico NR2B no córtex frontal de ratos adolescentes (Sircar & Sircar, 2006), uma área crítica na plasticidade neural e na formação da memória idade-dependente (Tang et al., 1999).

Na fase adulta, nicotina e etanol podem interagir de modo que um fármaco possa potencializar ou reduzir os efeitos do outro. A este respeito, a maioria dos relatos sobre efeitos cognitivos da co-administração de nicotina e etanol em roedores adultos indica que um fármaco atenua ou se opõe aos efeitos do outro (Gould & Lommock, 2003; Rezvani & Levin, 2002, 2003; Tracy et al., 1999). Por exemplo, enquanto a exposição à nicotina melhora a performance cognitiva em roedores, e também em humanos, com os efeitos de pico sendo observados durante o tratamento (Ernst et al., 2001; Hefco et al., 2004; Jacobsen et al., 2005; Levin & Rezvani, 2000; Rezvani & Levin, 2003), a co-administração de álcool bloqueia os melhoramentos promovidos pela nicotina na atenção e memória de ratos adultos (Rezvani & Levin, 2002, 2003).

Além disso, enquanto o etanol impede a atenção sustentada e a memória recente durante sua exposição e retirada em ratos (Çelik et al., 2005; Givens, 1997; Givens e McMahon, 1997), bem como a capacidade de atenção em humanos (Koelega, 1995; Parsons & Nixon, 1998), a co-administração de nicotina mostrou uma ação preventiva aos efeitos do etanol (Tracy et al., 1999). Este último achado conduz à sugestão de que o consumo concomitante de tabaco e álcool pode ser explicado pela reversão, mediada pela nicotina, dos danos cognitivos induzidos pelo etanol (Gould & Lommock, 2003; Tracy et al., 1999). Talvez mais importante, esta forte correlação funcional entre o consumo de

tabaco e álcool numa idade mais precoce (DiFranza & Guerrero, 1990; Grant, 1998) reforça o fato de que a adolescência é um período de vulnerabilidade e sugira que estas drogas compartilhem vias neuroquímicas que são particularmente sensíveis durante este período do desenvolvimento.

Ainda que o consumo de cigarros de tabaco e de bebidas alcoólicas comece durante a adolescência (Johnston et al., 2001; Pierce & Gilpin, 1996), um período de desenvolvimento que é considerado uma janela crítica para os efeitos da nicotina e do etanol, com efeitos únicos quando comparados aos que ocorrem em adultos (Spear, 2000), e a despeito dos achados epidemiológicos indicarem uma freqüente associação entre o consumo de tabaco e álcool (Carmody et al., 1985; Dawson, 2000; DiFranza & Guerrero, 1990; Grant, 1998; Larsson & Engel, 2004; Miller & Gould, 1998), um número muito limitado de estudos tem investigado o potencial das interações comportamentais de nicotina e etanol durante a adolescência.

É evidente que aprendizagem e memória são um aspecto comportamental afetados pela exposição à nicotina e ao etanol. Entretanto, ainda há muito a ser conhecido sobre a base neurobiológica da exposição a estas drogas no cérebro adolescente. Desta forma, a proposta deste estudo é examinar os efeitos da administração de nicotina e/ou etanol durante a adolescência na memória/aprendizado ao final do período de administração da droga e na retirada. Para tanto, será empregado o teste da esQUIVA passiva, um teste largamente utilizado para se avaliar memória e aprendizagem em roedores (Popovic et al., 2004; Ricceri et al., 2002).

2. OBJETIVOS

- Identificar os efeitos da administração isolada de nicotina ou de etanol ao longo da adolescência de camundongos na memória/aprendizado;
- Identificar os efeitos da exposição concomitante a nicotina e etanol na memória/aprendizado do camundongo adolescente;
- Verificar se as alterações cognitivas persistem no período de retirada das drogas até a idade adulta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de dissertação de Mestrado é de natureza experimental e foi integralmente desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (DCF/IBRAG/UERJ). As técnicas de avaliação comportamental aqui apresentadas vêm sendo usualmente empregadas com sucesso em nosso laboratório e fazem parte de trabalhos recentemente apresentados em congressos, nacional (Medeiros et al., 2007) e internacional (Abreu-Villaça et al., 2006), bem como publicados em revistas indexadas de circulação internacional (Abreu-Villaça et al., 2007, 2006; Filgueiras & Manhães, 2004; Manhães, 2003; Krahe et al., 2002). Todos os procedimentos adotados neste trabalho atendem às deliberações da Comissão de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, vinculada à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde).

3.1. Animais experimentais

O tamanho da amostra foi determinado de acordo com: (1) as determinações do Conselho de Ética; os animais experimentais deveriam ser gerados de forma que os dados cheguem à significância estatística ($P < 0,05$) com o menor n possível; (2) o total de animais foi baseado em estudos prévios na literatura que indicam que a quantidade de animais utilizados por subgrupo seria apropriada para este estudo (Adriani et al., 2002; Farr et al., 2005; Korkosz et al., 2006; López-Moreno et al., 2004; Rezayof et al., 2007).

Desta forma, o estudo completo do impacto da exposição à nicotina e ao etanol durante a adolescência consta de 251 camundongos da cepa C57Bl/6 provenientes de 60 ninhadas (128 fêmeas e 123 machos). Aqueles animais que não entraram na câmara escura no 1º dia de teste comportamental foram excluídos (ao todo, 6 animais).

Para determinar a data do nascimento e assegurar que o tratamento seria iniciado no 30º dia pós-natal (PN30), quando o camundongo inicia o período da adolescência (Spear, 2000), todos os animais foram gerados, criados e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia (DCF/IBRAG/UERJ) com temperatura controlada em torno de 21°C, ciclo de luminosidade de 12 horas (início do ciclo claro às 2:00 H) e livre acesso à comida e água.

No primeiro dia pós-natal (PN1), certificamo-nos de que havia um número máximo de oito filhotes por ninhada para permitir que os animais tivessem condições nutricionais adequadas. Caso houvesse um número superior a oito filhotes, os demais eram redistribuídos para ninhadas com número de filhotes inferior a oito e de mesma idade ou sacrificados. As ninhadas foram desmamadas no 25º dia pós-natal (PN25), separadas por sexo e, em PN29, os camundongos foram individualizados.

A exposição à nicotina e ao etanol se deu do 30º ao 45º dia de vida pós-natal (PN30 a PN45). Em roedores, o período de PN30 a PN45 corresponde à idade aproximada durante a qual animais de ambos os gêneros exibem características comportamentais típicas e fenômenos neuroquímicos e endócrinos particulares do adolescente (Spear, 2000).

3.2. Distribuição dos animais por grupo experimental

3.2.1. Grupo exposto à nicotina e ao etanol (NIC+ETOH)

Nicotina (free base – 50µg/ml) (Sigma, St Louis, MO) dissolvida em sacarina a 2% foi ofertada como única forma de ingestão de fluido. Ao invés das tradicionais garrafas de água utilizadas para roedores, adaptamos pipetas plásticas graduadas com capacidade para comportar 25 ml que foram preenchidas com 20 ml de solução. A utilização das pipetas permitiu maior precisão na quantificação diária da ingestão de fluido.

Durante seu período de atividade, fumantes regulares tendem a fumar intermitentemente de forma a manter os níveis plasmáticos de nicotina acima da concentração mínima efetiva. Desta forma, escolhemos dar aos animais livre acesso à solução de nicotina na ingesta líquida, o que lhes permitiu o consumo da droga durante seu período ativo. A solução da droga foi trocada diariamente ao longo dos 15 dias de tratamento.

Uma solução de etanol diluída em salina a 25% (v/v) (2g de etanol/Kg de peso do animal) foi administrada em dias alternados para melhor simular o consumo cíclico do álcool feito por adolescentes (Pascual et al., 2007; Tokunaga et al., 2006; White et al., 2000). As injeções de etanol foram aplicadas via intra-peritoneal (i.p.), sendo a primeira no primeiro dia de tratamento (PN30) e, a partir de então, em dias alternados até o final do período de exposição à droga. Desta forma, a última injeção foi administrada em PN44. Este desenho experimental implica em que, durante o período de exposição na

adolescência, a cada 48 H os camundongos apresentassem um período de intoxicação pelo etanol seguido de um período de retirada (Parnell et al., 2006).

3.2.2. Grupo exposto à nicotina (NIC)

Neste grupo, nicotina (free base – 50µg/ml) (Sigma, St Louis, MO) dissolvida em sacarina a 2% foi ofertada na pipeta plástica graduada, como descrito acima. Para submeter todos os grupos às mesmas condições de estresse, os animais expostos à nicotina receberam injeções de salina (i.p.) em dias alternados de acordo com o peso do animal, sendo a primeira em PN30 e a última em PN44.

3.2.3. Grupo exposto ao etanol (ETOH)

A solução a 25% de etanol (v/v) (2g/kg) em salina foi administrada em dias alternados (i.p.). Nas pipetas de água, os animais receberam solução de sacarina a 2% de modo que este grupo diferisse do exposto à nicotina somente pela ausência desta droga no líquido ofertado.

3.2.4. Grupo controle (VEH)

Neste grupo, os animais receberam sacarina a 2% em uma pipeta contendo 20 ml de líquido. Para sofrerem a mesma manipulação e estresse, o grupo controle também recebeu injeções de solução salina (2g/kg) i.p. em dias alternados.

A fim de evitar um efeito comportamental de ninhada, os animais de cada ninhada foram designados aleatoriamente para diferentes grupos de exposição e idades dos testes comportamentais conforme mostra o Quadro 2 a seguir.

Quadro 2 – Distribuição de camundongos por idade, sexo e tratamento

TRATAMENTO	PN45		PN50		PN75		TOTAL
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	
NIC+ETOH	10	10	9	13	11	10	63
NIC	10	10	11	10	10	11	62
ETOH	10	11	11	11	10	11	64
VEH	10	10	11	11	10	10	62
Total	40	41	42	45	41	42	251

3.3. Tratamento

3.3.1 Administração de nicotina e etanol e medidas de peso e ingesta

No primeiro dia de tratamento (PN30), cada animal foi levado em sua gaiola para a sala de Análise Comportamental do Laboratório de Neurofisiologia, localizada ao lado do biotério, sendo então pesado em uma balança. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção (i.p.) de etanol ou salina de acordo com seu peso (2g/kg). Após a injeção, o animal foi recolocado em sua gaiola e levado de volta ao biotério, onde teve sua garrafa de água substituída por uma pipeta contendo 20 ml de solução de nicotina ou de sacarina de acordo com o grupo experimental a que pertencesse.

Diariamente, a quantidade de líquido ingerida pelos animais foi quantificada e as soluções remanescentes foram descartadas. Para desconsiderar um eventual vazamento nas pipetas com a solução e não mensurar equivocadamente o valor da ingesta, foram colocadas duas pipetas com solução de sacarina, 20 ml cada, numa caixa vazia (“branco”) de modo que o valor médio de líquido vazado no “branco” fosse subtraído da medida de ingesta relativa àquele dia.

Após a quantificação da ingestão de líquido, os animais eram transportados em suas caixas do biotério para a sala de Análise Comportamental. Nesta sala, entre as 11:00 H e 13:00 H, os animais eram pesados, reproduzindo-se assim o procedimento do primeiro dia de tratamento à exceção da injeção, que se dava em dias alternados a partir de PN30. Os animais eram então transportados de volta ao biotério onde uma pipeta contendo uma nova solução (nicotina ou sacarina) era disponibilizada em cada gaiola. Para evitar possíveis situações de estresse pelo tempo prolongado fora do biotério, as soluções para consumo dos animais foram preparadas antes da manipulação dos mesmos. Devido ao aumento significativo do peso corporal que ocorre durante a adolescência, os dados relativos ao consumo diário de fluido (ingesta) foram obtidos dividindo os valores absolutos da ingesta líquida de cada animal por seu próprio peso corporal (peso) (ingesta/peso).

Uma vez que os grupos ETOH e VEH não receberam nicotina em seu tratamento, o consumo diário desta droga foi quantificado apenas nos grupos NIC+ETOH e NIC. Este cálculo foi feito da seguinte forma: multiplicamos o valor da dose de nicotina recebida (50µg/ml) pelo valor da ingesta de líquida do dia *i* e dividimos pelo peso do animal correspondente ao dia da ingesta.

$$NICOTINA_{DIAi} = \frac{DOSE \times INGESTA_{DIAi}}{PESO_{DIAi}}$$

Sendo:

$NICOTINA_{DIAi}$: consumo de nicotina (em $\mu\text{g/g}$ ou em mg/Kg) no dia i ;

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

$INGESTA_{DIAi}$: volume (em ml) de solução ingerido no dia i ;

$PESO_{DIAi}$: peso do animal (em g) no dia i .

3.4. Testes comportamentais

Todos os animais foram submetidos a dois dias consecutivos de teste na caixa da esQUIVA passiva (*step-through passive avoidance box*, ou PA). Os testes comportamentais ocorreram em três diferentes períodos: ao final do período de administração (PN44-45), durante um curto-prazo de retirada (PN49-50) ou durante um longo período de retirada, com os animais já na idade adulta, em (PN74-75). Para os animais testados em PN44-45, a fim de evitar efeitos agudos da droga, como alterações motoras, a última injeção de etanol foi administrada em PN44 imediatamente após o primeiro teste.

A fim de diminuir situações de estresse que pudessem interferir no resultado do experimento, o horário para a realização dos testes comportamentais, bem como o local de realização destes, foram os mesmos utilizados ao longo do tratamento: entre 11:00 H e 13:00 H, na sala de Análise Comportamental – a sala era previamente climatizada (21°C aproximadamente) e os animais eram ambientados por 10 minutos antes de serem testados.

3.4.1. A esQUIVA passiva

A caixa da esQUIVA passiva é constituída por dois compartimentos contíguos, sendo um branco (câmara clara) e o outro preto (câmara escura). Ambas as câmaras possuem barras de material condutor de eletricidade (cobre) em seu piso capazes de administrar um choque nas patas do animal em teste. A câmara clara é aberta e intensamente iluminada por uma lâmpada de luz branca de 15 Watts de potência – 127 volts. A câmara escura é coberta por uma tampa removível. Entre essas câmaras, existe uma porta do tipo guilhotina através da qual espera-se que o animal passe. Cada câmara tem por medida 20×16×15,6 cm (comprimento × largura × altura). A Figura 1 mostra o equipamento descrito utilizado no teste da esQUIVA passiva.

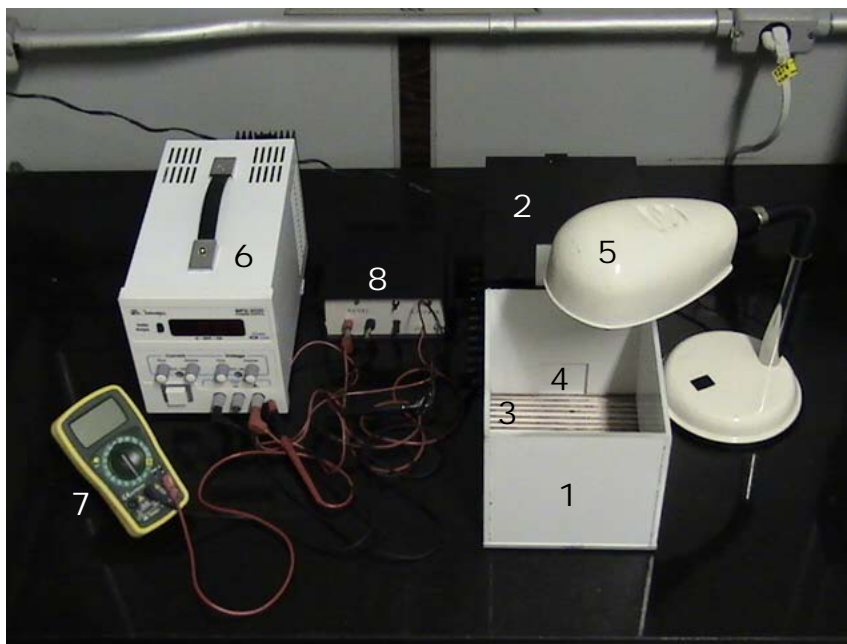


Figura 1: Caixa da esQUIVA passiva e equipamento utilizado para o teste: (1) câmara clara, (2) câmara escura, (3) assoalho metálico, (4) porta, (5) luminária, (6) regulador de corrente, (7) multímetro, (8) temporizador.

Acoplados à caixa da esQUIVA passiva, encontram-se: uma luminária com a lâmpada de luz branca para tornar a câmara clara um ambiente ainda mais aversivo ao camundongo; um regulador de corrente para controlar a amperagem da corrente elétrica; um multímetro, para aferir a intensidade da corrente liberada (2 mA); um temporizador, que será acionado no momento em que o animal cruzar para a câmara escura a fim de disparar o choque pelo tempo previamente determinado e ajustado (2 s).

Ao final do período de exposição (PN44), no curto período de retirada (PN49) e na idade adulta (PN74), os animais foram submetidos ao 1º dia de teste da esQUIVA passiva. Cada animal foi colocado na câmara iluminada e esperou-se por até cinco minutos para que ele entrasse na câmara escura (período de latência). Ao animal entrar na câmara escura, a porta se fecha e um choque é administrado nas patas (2 mA; 2 s). O tempo gasto pelo animal para entrar na câmara escura no 1º dia de teste foi anotado. O 2º dia de teste na esQUIVA passiva se deu vinte e quatro horas depois e os animais foram submetidos ao mesmo procedimento do 1º dia de teste, exceto o choque, que não foi aplicado. O período de latência do 2º dia de teste também foi anotado.

3.4.2. Índice de memória/aprendizado

Há vários relatos indicando que a exposição à nicotina e ao etanol, bem como a retirada, afetam o comportamento do animal (Adriani et al., 2004; Binnie et al., 2004;

Bammer & Chesher, 1982; Rezvani & Levin, 2002, 2003; Tokunaga et al., 2006), como a exploração voluntária da câmara (Kota et al., 2007). Desta forma, para que os efeitos dos aspectos da tarefa que não são relacionados diretamente a memória/aprendizado pudessem ser minimizados e para visualizar mais claramente a diferença entre os grupos, o componente de memória/aprendizado foi avaliado através do seguinte índice:

$$\text{ÍNDICE} = (PA2 - PA1) \div PA1$$

Onde:

PA1: Tempo de latência no 1º dia de teste na esquiwa passiva

PA2: Tempo de latência no 2º dia de teste na esquiwa passiva

3.5. Análise estatística

3.5.1. Análise da relação consumo de líquido / peso corporal, consumo de nicotina e peso corporal

Os dados foram compilados como médias e erros padrão da média. Inicialmente, foram realizadas as medidas das análises de variância de repetição (ANOVA, dados log-transformados sempre que a variação era heterogênea) em cada variável (consumo de líquido/peso corporal; consumo de nicotina; peso corporal). TRATAMENTO (VEH, NIC, ETOH e NIC+ETOH) e SEXO foram usados como fatores. O DIA foi considerado o fator de repetição. Sempre que interações significativas entre TRATAMENTO×DIA foram detectadas, análises post-hoc foram realizadas usando o FPLSD (Fisher's Protected Least Significant Difference). Sempre que interações significativas entre TRATAMENTO×SEXO foram detectadas, ANOVAs apropriadas de menor ordem foram utilizadas, seguidas pelas análises comparativas post-hoc (FPLSD).

3.5.2. Análise de PA1, PA2 e do índice (PA2-PA1)/PA1

Os dados foram compilados como médias e erros padrão da média. Para reduzir a probabilidade do erro estatístico tipo 1, que pode resultar de uma série de testes repetidos dos dados globais PA1 e PA2, os resultados foram avaliados, primeiramente, por uma análise de variância de repetição global (ANOVA, dados log-transformados sempre que a variação era heterogênea), considerando-se todos os fatores: TRATAMENTO (VEH, NIC, ETOH e NIC+ETOH), IDADE (PN44-45, PN49-50, PN74-75) e SEXO. SESSÃO (para os

dados PA1 e PA2) foi considerada como o fator de repetição. Se fosse observado efeito da IDADE ou alguma interação com este fator, as ANOVAs eram executadas separadamente com os resultados de cada grupo de idade usando TRATAMENTO e SEXO como fatores. Em cada idade, ANOVAs apropriadas de menor ordem foram utilizadas sempre que interações significativas entre TRATAMENTO×SEXO fossem detectadas.

Também foi executada uma análise de variância global univariada (ANOVAu) usando o índice para memória/aprendizado (PA2-PA1)/PA1 como variável e TRATAMENTO, IDADE e SEXO como fatores. Se fosse observado efeito da IDADE ou alguma interação com este fator, ANOVAs eram executadas separando os resultados de cada grupo de idade usando TRATAMENTO e SEXO como fatores. Em cada idade, ANOVAs apropriadas de menor ordem foram utilizadas sempre que interações significativas entre TRATAMENTO×SEXO fossem detectadas. Análises post-hoc foram realizadas pelo teste FPLSD.

3.5.3. Análise da interação entre nicotina e etanol

O desenho estatístico unidimensional descrito acima, em que TRATAMENTO (VEH, NIC, ETOH e NIC+ETOH) foi considerado um fator, foi usado para verificar se existiram diferenças significativas entre os quatro grupos do tratamento. Entretanto, o uso combinado de nicotina e de etanol pode ter efeitos mais-que-aditivo (sinergismo), menos-que-aditivo ou aditivo, efeitos estes não detectáveis em um desenho unidimensional. Conseqüentemente, uma análise bidimensional (Abreu-Villaça et al., 2007, 2004a, 2004b, 2007; Rhodes et al., 2003) foi usada. Neste desenho, NICOTINA (tratado: NIC e NIC+ETOH; não-tratado: VEH e ETOH) foi considerado um dos fatores e ETANOL (tratado: ETOH e NIC+ETOH; não-tratado: VEH e NIC) foi considerado o outro fator.

Desta forma, efeitos mais-que-aditivos (sinergismo) e menos-que-aditivos aparecem como interações significativas entre as duas dimensões do tratamento (NICOTINA e ETANOL), visto que os efeitos aditivos não mostram interações significativas. Os efeitos de fatores individuais foram considerados significativos quando $P < 0,05$ (bi-caudal). Para interações entre fatores os efeitos foram considerados significativos quando $P < 0,10$ (bi-caudal) (Snedecor, 1967).

3.5.4. Medida e análise da ansiedade

Além da quantificação do período de latência em cada um dos dias de teste, foi avaliado o número de bolos fecais (B) no instrumento de teste da esQUIVA passiva como uma medida do nível de ansiedade (Paterson, 2000). Conseqüentemente, além das medidas de memória/aprendizado, para cada animal, calculou-se um índice dividindo B na câmara iluminada no primeiro teste pelo tempo de permanência nesta câmara (B/min), índice este que foi usado como medida da ansiedade.

A respeito da medida da ansiedade, o coeficiente não-paramétrico de Kendall (τ) foi calculado a fim verificar se B/min esteve associado ao PA1 e ao índice (PA2-PA1)/PA1. As diferenças entre os grupos a respeito da distribuição de B/min foram avaliadas inicialmente por meio de um teste de Kruskal-Wallis (K-W). As comparações post-hoc foram realizadas pelos testes U de Mann-Whitney (M-W).

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos na ingesta/peso, consumo de nicotina e peso corporal

Como indicado pela ANOVA, a relação ingesta líquida/peso corporal aumentou ao longo do experimento (DIA: $F = 80,8$, $gl = 7,9$, $P < 0,0001$; dias 1–5: $0,27 \pm 0,004$ ml/g; dias 6–10: $0,32 \pm 0,003$ ml/g; dias 11–15: $0,34 \pm 0,003$ ml/g), como pode ser visto na Figura 2 abaixo. Houve um efeito principal do TRATAMENTO ($F = 6,2$, $gl = 3$, $P < 0,0001$): a exposição à nicotina promoveu uma redução significativa da relação ingesta/peso relativamente aos grupos VEH ($P < 0,0002$, FPLSD) e ETOH ($P < 0,006$, FPLSD) (Tabela 1), o que sugere um efeito do sabor aversivo da nicotina. As injeções de etanol por si só não produziram um efeito sobre a ingesta/peso (uma vez que ETOH = VEH, $P = 0,27$, FPLSD) (Tabela 1). Os animais que receberam o tratamento combinado mostraram uma redução na relação ingesta líquida/peso corporal (NIC+ETOH < VEH, $P < 0,003$, FPLSD) semelhante ao obtido no tratamento somente com nicotina (sendo NIC = NIC+ETOH, $P = 0,39$, FPLSD) (Tabela 1). A análise bi-dimensional dos fatores de tratamento não indicou uma interação significativa entre NICOTINA×ETANOL, demonstrando que as injeções de etanol não alteraram a resposta à administração de nicotina. Não houve interação entre TRATAMENTO e SEXO.

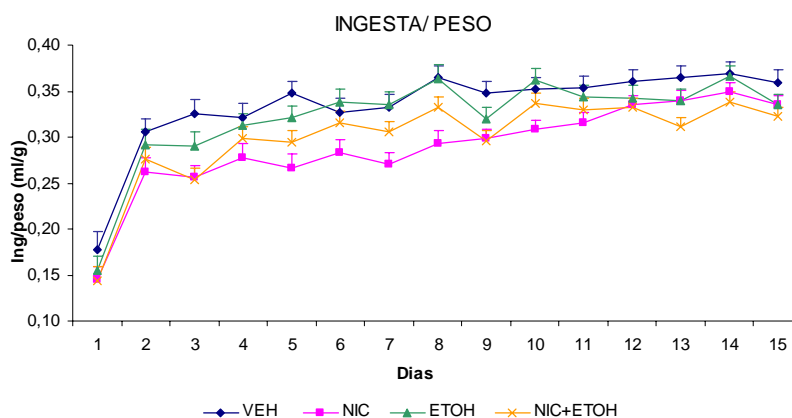


Figura 2. A relação ingesta/peso diferiu entre os grupos experimentais ao longo dos dias de tratamento. Os grupos NIC e NIC+ETOH apresentaram uma redução semelhante na ingesta/peso. O grupo exposto à nicotina diferiu significativamente em relação aos grupos VEH e ETOH. O grupo que sofreu a dupla exposição também apresentou uma redução na ingesta/peso em comparação ao grupo VEH. Não houve efeito significativo do sexo na relação ingesta/peso.

O consumo de nicotina aumentou significativamente (DIA: $F = 47,9$, $gl = 7,9$, $P < 0,0001$) ao longo do experimento como mostra a Figura 3. Também encontramos uma interação de TRATAMENTO×DIA ($F = 56,4$, $gl = 7,9$, $P < 0,04$), entretanto, isto refletiu resultados inconsistentes uma vez que diferenças significativas entre os grupos foram

restritas a dois dias, aliado ao fato de que nenhuma polarização sistemática foi observada: uma redução no consumo para o grupo NIC quando comparado ao grupo NIC+ETOH restrita ao oitavo dia ($F = 4,5$, $gl = 1$, $P < 0,04$) e, inversamente, um aumento no consumo para o grupo NIC quando comparado ao grupo NIC+ETOH restrita ao décimo terceiro dia de exposição ($F = 4,1$, $gl = 1$, $P < 0,05$) (Figura 3). Não houve nenhuma interação principal com TRATAMENTO ou TRATAMENTO×SEXO (Tabela 1).

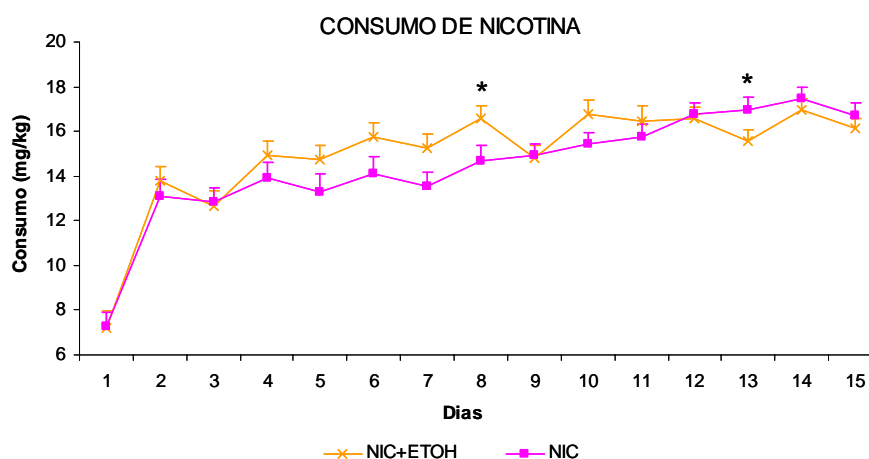


Figura 3: Consumo de nicotina ao longo dos dias de tratamento. Embora tenha aumentado significativamente ao longo do experimento, o consumo não foi consistentemente afetado pelo tratamento. Houve uma redução do consumo do grupo NIC no 8º dia e um aumento do consumo da droga no 13º dia em relação ao grupo NIC+ETOH. * $P < 0,05$.

A despeito das diferenças encontradas em ingesta/peso e no consumo de nicotina relacionadas aos diferentes tratamentos, o ganho de peso corporal não foi afetado pelo tratamento. Nenhum efeito ou interação com TRATAMENTO foi observado (Figuras 4A e B; Tabela 1).

Tabela 1 – Ingesta de líquido / peso corporal, consumo de nicotina e peso corporal.

Medidas		VEH	NIC	ETOH	NIC+ETOH
Ingesta/Peso (a)		0,33±0,004†	0,29±0,004	0,32±0,004*	0,30±0,003
Consumo (b)		–	14,4±0,181	–	15,0±0,173
Peso Corporal (c)	machos	15,32±0,123	14,36±0,151	14,0±0,139	13,87±0,150
	fêmeas	12,84±0,102	12,12±0,107	12,66±0,106	12,88±0,103

(a) ml/g; (b) mg/kg; (c) g.

* Valores para os quais havia uma diferença significativa para o grupo NIC.

† Valores para os quais havia uma diferença significativa para o grupo NIC+ETOH

($P < 0,05$) Média ± Erro Padrão. VEH – grupo controle; NIC – grupo exposto à nicotina; ETOH grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH grupo exposto à nicotina e ao etanol.

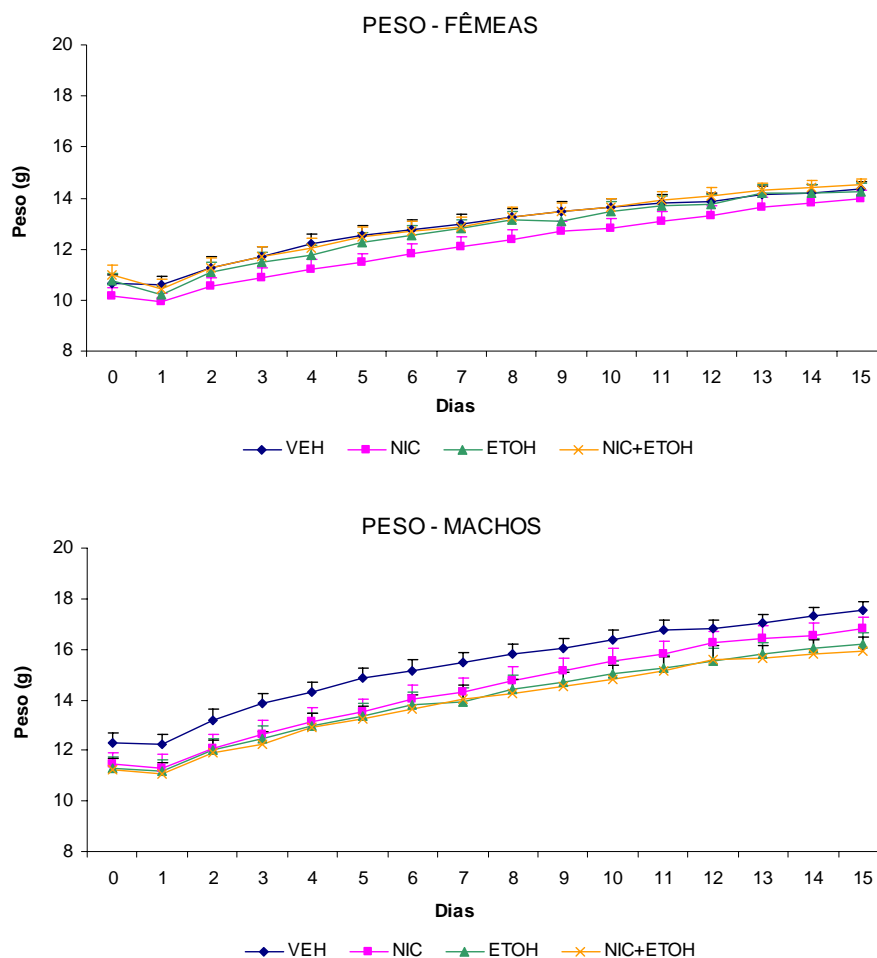


Figura 4: Medida de peso corporal ao longo do período de tratamento. Não houve efeito do tratamento sobre o ganho de peso.

4.2. Análise estatística global das medidas de memória/aprendizado

Ambas as ANOVAr (PA1 e PA2) e ANOVAu globais ((PA2-PA1)/PA1) indicaram que as análises unidimensional e bidimensional apresentaram efeitos e interações significativos, como indicado na Tabela 2. Desta forma, foram necessárias análises de menor ordem: dadas às interações de cada tratamento com IDADE, separamos os dados de acordo com a idade do grupo e, então, reexaminamos os resultados. Os tratamentos também interagiram com SEXO, então, após a subdivisão dos dados, mantivemos esta variável para saber se as interações com o tratamento permaneciam detectáveis.

Tabela 2 – Análise global dos efeitos em memória/aprendizado.

Efeito	Desenho unidimensional
ANOVA_r (PA1, PA2)	
SESSÃO×TRATAMENTO	F=2,5, gl=3, P=0,060
SESSÃO×TRATAMENTO×IDADE	F=4,3, gl=6, P<0,0001
SESSÃO×TRATAMENTO×IDADE×SEXO	F=2,1, gl=6, P=0,058
ANOVA_u ((PA2-PA1)/PA2)	
TRATAMENTO	F=2,7, gl=3, P=0,048
TRATAMENTO ×IDADE	F=4,5, gl=6, P<0,0001
TRATAMENTO×IDADE×SEXO	F=2,1, gl=6, P=0,060
Efeito	Desenho bidimensional
ANOVA_r (PA1, PA2)	
SESSÃO× TRATAMENTO×IDADE	F=7,2, gl=2, P=0,001
SESSÃO×TRATAMENTO NIC×IDADE	F=4,4, gl=2, P=0,014
SESSÃO×TRATAMENTO NIC×IDADE×SEXO	F=3,5, gl=2, P=0,034
ANOVA_u ((PA2-PA1)/PA2)	
TRATAMENTO ETOH×IDADE	F=7,4, gl=2, P=0,001
TRATAMENTO NIC×IDADE	F=4,7, gl=2, P=0,010
TRATAMENTO NIC×IDADE×SEXO	F=3,3, gl=2, P=0,044

Os termos principais de efeitos e interações que não mostraram diferença significativa não foram mostrados na tabela.

4.3. Efeitos em memória/aprendizado

4.3.1. PN44-45

Ao final do período de exposição (PN44-45 – Figura 5A), a ANOVA_r unidimensional indicou que o tempo despendido pelos animais na câmara clara aumentou significativamente do primeiro para o segundo dia de teste (efeito da SESSÃO: $F = 125,9$, $gl = 1$, $P < 0,001$) e este aumento no período de latência foi afetado pelo TRATAMENTO (interação entre SESSÃO×TRATAMENTO: $F = 4,1$, $gl = 3$, $P < 0,01$), um fato que foi corroborado pela a análise do índice (PA2-PA1)/PA1 (ANOVA_u; efeito do TRATAMENTO: $F = 4,6$, $gl = 3$, $P = 0,006$). A análise post-hoc indicou que o grupo controle foi significativamente mais eficiente na tarefa de memória/aprendizado que os grupos ETOH (FPLSD; $P < 0,04$) e NIC+ETOH (FPLSD; $P < 0,001$) (Figura 5B). Diferenças próximas da significância foram observadas entre VEH e NIC (FPLSD; $P = 0,096$; $VEH > NIC$) e entre NIC e NIC+ETOH (FPLSD; $P = 0,055$; $NIC > NIC+ETOH$). A análise bidimensional não encontrou interações significativas entre NICOTINA×ETANOL, o que indicou que os efeitos do tratamento combinado não poderiam ser considerados menos-que-aditivos, conotando uma soma simples dos efeitos de nicotina e etanol.

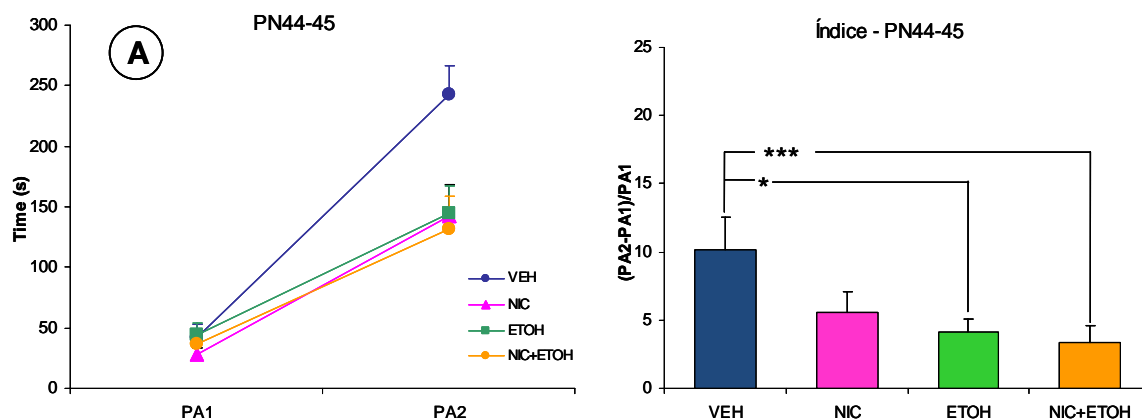


Figura 5: Efeitos do tratamento com nicotina e/ou etanol na memória/aprendizado de camundongos adolescentes avaliados na caixa de testes da esQUIVA passiva ao final do período de exposição (PN44-45). (A) Tempo que os animais levaram para cruzar para a câmara escura no primeiro (PA1) e segundo (PA2) dias de teste. (B) Índice de memória/aprendizado $((PA2-PA1)/PA1)$. Valores são médias \pm E.P.M. VEH, grupo controle; NIC, grupo exposto à nicotina; ETOH, grupo exposto ao etanol; NIC + ETOH, grupo exposto à nicotina e ao etanol. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, diferença significativa entre grupos demonstrada pelo FPLSD.

4.3.2. PN49-50

Durante o curto período de retirada (PN49-50 – Figura 6A), a ANOVA unidimensional também indicou que o tempo despendido pelos animais na câmara clara aumentou significativamente do primeiro para o segundo dia de teste (efeito da SESSÃO: $F = 174,8$, $gl = 1$, $P < 0,001$) e que o aumento do tempo foi afetado pelo TRATAMENTO (interação entre SESSÃO \times TRATAMENTO: $F = 4,9$, $gl = 3$, $P = 0,004$), o que foi corroborado novamente pela análise do índice de memória/aprendizado $(PA2-PA1)/PA1$ (ANOVAu; efeito TRATAMENTO: $F = 4,9$, $gl = 3$, $P = 0,004$). Entretanto, ao contrário dos resultados em PN44-45, a análise post-hoc indicou que o grupo NIC foi o mais eficiente na tarefa de memória/aprendizado, particularmente, quando comparado aos grupos ETOH (FPLSD; $P = 0,001$) e NIC+ETOH (FPLSD; $P = 0,013$) (Figura 6B). Uma diferença próxima da significância foi observada entre VEH e ETOH (FPLSD; $P = 0,056$; $VEH > ETOH$). Como previamente observado em PN44-45, a análise bidimensional não encontrou interações significativas entre NICOTINA \times ETANOL, indicando uma simples soma dos efeitos de nicotina e etanol.

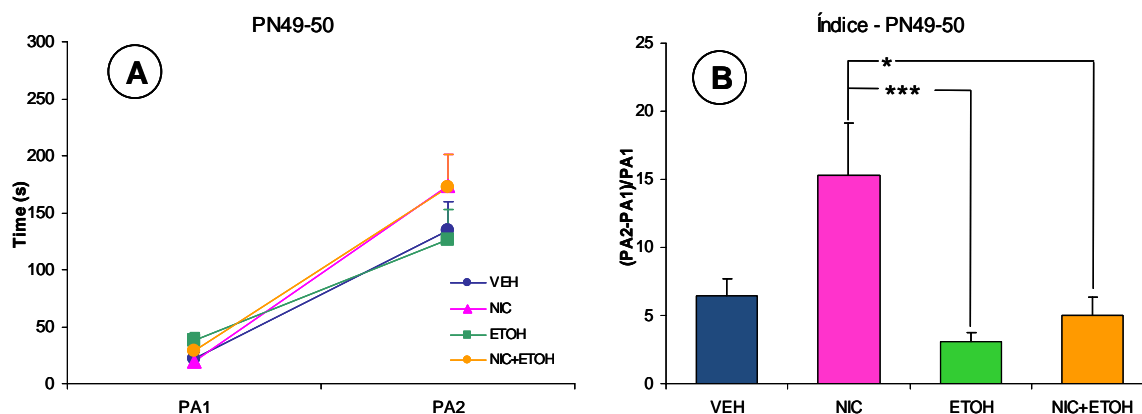


Figura 6: Efeitos do tratamento com nicotina e/ou etanol na memória/aprendizado de camundongos adolescentes avaliados na caixa de testes da esQUIVA passiva durante o curto período de retirada (PN49–50). (A) Tempo que os animais levaram para cruzar para a câmara escura no primeiro (PA1) e segundo (PA2) dias de teste. (B) Índice de memória/aprendizado $((PA2-PA1)/PA1)$. Valores são médias \pm E.P.M. VEH, grupo controle; NIC, grupo exposto à nicotina; ETOH, grupo exposto ao etanol; NIC + ETOH, grupo exposto à nicotina e ao etanol. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, diferença significativa entre grupos demonstrada pelo FPLSD.

4.3.3. PN74-75

Durante o longo período de retirada (PN74-75 – Figuras 7A e B), a ANOVA unidimensional novamente indicou que o tempo de latência na câmara clara aumentou significativamente do primeiro para o segundo dia de teste (efeito da SESSÃO: $F = 139,6$, $gl = 1$, $P < 0,001$). Este aumento no tempo foi afetado pelo TRATAMENTO de maneira dependente do SEXO (interação entre SESSÃO \times TRATAMENTO \times SEXO: $F = 4,2$, $gl = 3$, $P < 0,01$). Estes achados são confirmados pela análise do índice $(PA2-PA1)/PA1$ (ANOVAu; interação entre TRATAMENTO \times SEXO: $F = 4,2$, $gl = 3$, $P < 0,01$). De fato, um efeito significativo do TRATAMENTO foi observado somente em fêmeas (ANOVAu; efeito do TRATAMENTO: $F = 4,2$, $gl = 3$, $P < 0,01$). A análise post-hoc indicou que fêmeas do grupo NIC+ETOH foram as mais eficientes na tarefa de memória/aprendizado quando comparadas aos grupos VEH (FPLSD; $P = 0,007$), NIC (FPLSD; $P = 0,016$) e ETOH (FPLSD; $P = 0,003$) (Figura 7C). A análise bidimensional encontrou uma interação significativa entre NICOTINA \times ETANOL, revelando um efeito sinergista da nicotina e etanol nas fêmeas.

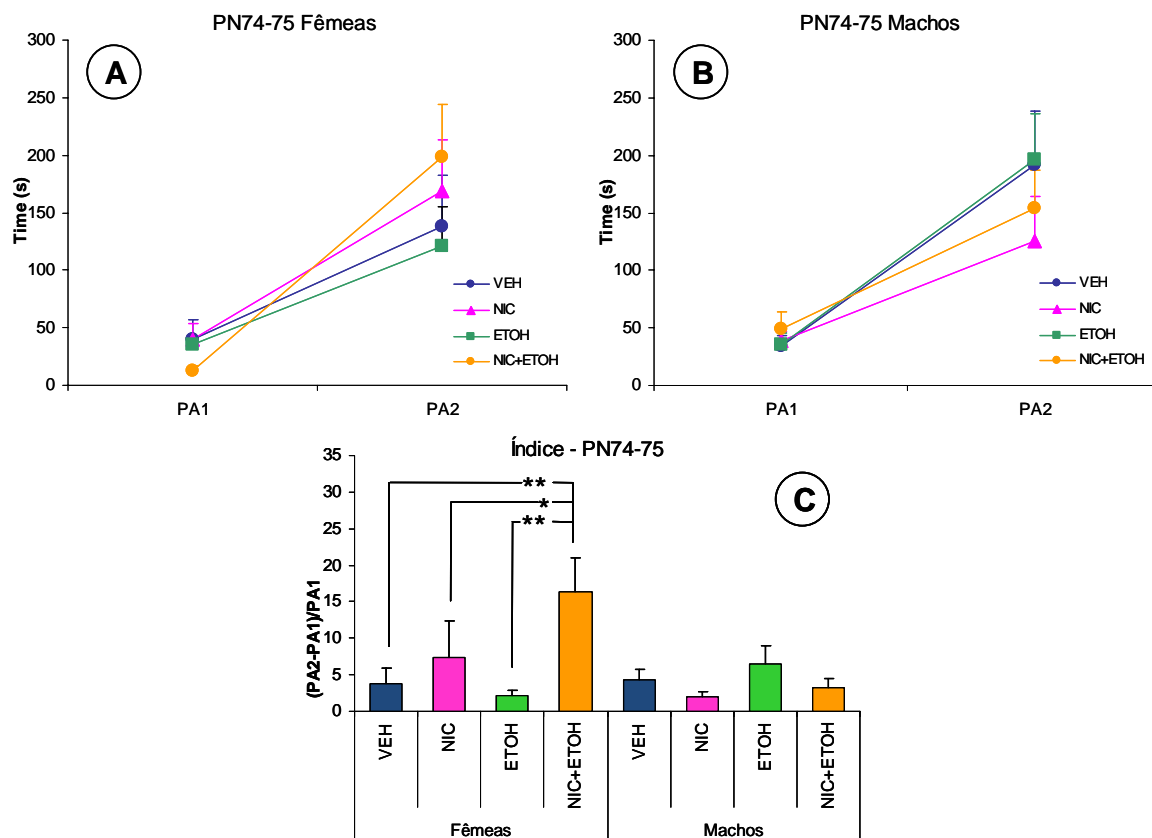


Figura 7: Efeitos do tratamento com nicotina e/ou etanol na memória/aprendizado de camundongos adolescentes avaliados na caixa de testes da esquiwa passiva um mês após o período de exposição (PN74-75). (A) Tempo que as fêmeas levaram para cruzar para a câmara escura no primeiro (PA1) e segundo (PA2) dias de teste. (B) Tempo que os machos levaram para cruzar para a câmara escura no primeiro (PA1) e segundo (PA2) dias de teste. (C) Índice de memória/aprendizado ((PA2-PA1)/PA1). Valores são médias±E.P.M. VEH, grupo controle; NIC, grupo exposto à nicotina; ETOH, grupo exposto ao etanol; NIC + ETOH, grupo exposto à nicotina e ao etanol. *P < 0,05, **P < 0,01, diferença significativa entre grupos demonstrada pelo FPLSD.

4.4. Efeitos da ansiedade

O primeiro contato com a caixa da esquiwa passiva provocou uma reação de defecação nos camundongos (VEH: $1,8 \pm 0,60$ B/min; NIC: $2,1 \pm 0,57$ B/min; ETOH: $2,6 \pm 0,72$ B/min; NIC+ETOH: $2,5 \pm 0,44$ B/min), o que é considerado um comportamento relacionado à ansiedade. A medida B/min não foi associada a PA1 ($\tau = 0,005$, $P > 0,10$) nem ao índice (PA2-PA1)/PA1 ($\tau = 0,08$, $P > 0,10$). Diferenças significativas entre os grupos de tratamento foram encontradas em relação a B/min (KW: $\chi^2 = 7,9$, $gl = 3$, $P = 0,049$). As comparações post-hoc indicaram que apenas a exposição combinada a NIC+ETOH provocou um aumento significativo em B/min relativo ao grupo controle (M-W: $Z = 2,6$, $P = 0,01$), sugerindo um efeito ansiogênico da exposição combinada à nicotina e ao etanol. A medida B/min não variou em função da idade ou do sexo dos animais.

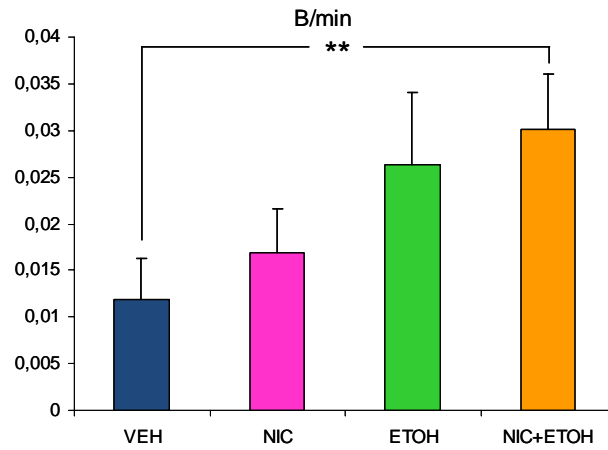


Figura 8: Efeitos da ansiedade no primeiro contato com a caixa de testes da esquiva. A dupla exposição às drogas teve um efeito ansiogênico significativo em relação ao grupo controle. VEH, grupo controle; NIC, grupo exposto à nicotina; ETOH, grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH, grupo exposto à nicotina e ao etanol. **P < 0,01.

5. DISCUSSÃO

O consumo de bebidas alcoólicas e o fumo de cigarros de tabaco estão freqüentemente associados durante a adolescência (Carmody et al., 1985; Dawson, 2000; Di Franza & Guerrero, 1990; Grant, 1998; Larsson & Engel, 2004; Miller & Gold, 1998). Apesar dos dados epidemiológicos, pouco se sabe sobre as possíveis interações entre estas drogas, particularmente, no crítico período da adolescência. O presente estudo experimental traz evidências da interação funcional entre nicotina e etanol na regulação da resposta comportamental focando na memória/aprendizado em camundongos adolescentes.

5.1. Considerações metodológicas

Considerando que ratos e algumas linhagens de camundongos têm aversão ao sabor da nicotina, camundongos C57BL/6 foram selecionados pelo fato de que animais adultos e periadolescentes desta linhagem consomem nicotina na concentração aqui utilizada (Klein et al., 2003, 2004; Sparks & Pauly, 1999). De fato, tem sido demonstrado que a nicotina administrada via oral também causa alterações comportamentais (Adriani et al., 2002, 2004; Gaddnas et al., 2001) e bioquímicas incluindo a suprarregulação de receptores nicotínicos (Nuutinen et al., 2005; Sparks & Pauly, 1999), alteração dos níveis e metabolismo de monoaminas (Gaddnas et al., 2000; Tammimaki et al., 2006; Vihavainen et al., 2006), bem como a alteração da expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica induzida por drogas de abuso (Marttila et al., 2006).

Esta cepa de camundongos ainda é conhecida por apresentar características particulares, como o alto consumo voluntário de álcool (Crawley et al., 1997), que devem ser levadas em consideração em estudos que envolvam a auto-administração desta substância, mesmo que as bases fisiológicas referentes a estas características específicas da linhagem permaneçam mal compreendidas (Crabbe et al., 1999). Como resultado, generalizações devem ser feitas criteriosamente.

A concentração de nicotina utilizada na solução líquida ingerida pelos animais no presente estudo (Klein et al., 2003, 2004; Sparks & Pauly, 1999) produz, após sua absorção na cavidade oral, níveis plasmáticos de cotinina que são comparáveis àqueles encontrados em fumantes adolescentes (Binnie et al., 2004; Caraballo et al., 2004; Wood et al., 2004). A respeito do etanol, além das mudanças neurofisiológicas ocorridas na adolescência, outras interferem na absorção, distribuição e eliminação do etanol nesta fase do

desenvolvimento. Adolescentes apresentam uma maior atividade da enzima álcool desidrogenase (Lad et al., 1984) e, por sua vez, uma maior eliminação da droga (Kelly et al., 1987). Entretanto, estudos prévios em roedores adolescentes demonstraram que a dose moderada usada no presente estudo resulta em níveis sanguíneos bem acima do limite legalmente permitido para se beber (Parnell et al., 2006; Silveri & Spear, 2000).

Uma vez que alguns estudos indicam que os níveis plasmáticos de etanol são reduzidos em animais concomitantemente expostos à nicotina (Chen & Harle, 2005; Gilbertson & Barron, 2005; Nowak et al., 1987; Scott et al., 1993), pode ser argumentado que os efeitos da exposição combinada à nicotina e ao etanol descritos no presente estudo sejam devidos à redução dos níveis plasmáticos de etanol promovidos pela nicotina. Entretanto, esta redução foi descrita apenas em animais que receberam etanol via oral, e parece ser devida ao atraso do esvaziamento gástrico promovido pela nicotina (Chen & Harle, 2005; Gilbertson & Barron, 2005; Nowak et al., 1987; Scott et al., 1993), levando ao aumento da metabolização do etanol pela enzima gástrica álcool desidrogenase (Oneta et al., 1998). O que também tem sido demonstrado em administrações de etanol tanto por via intravenosa (i.v.) (Hisaoaka & Levy, 1985) quanto intraperitoneal (i.p.) (Parnell et al., 2006), é que as concentrações de etanol não são afetadas pela exposição crônica à nicotina. Assim, as interações metabólicas nicotina-etanol não são aparentemente capazes de explicar nossos achados. De fato, mais evidências indicam que as interações entre nicotina e etanol não têm origem farmacocinética dado à nicotina não afetar a eliminação de etanol e vice versa (Collins et al., 1988).

Considerando que os efeitos em memória/aprendizado são dose-dependentes para a nicotina (Rezvani & Levin, 2002), diferenças na relação ingesta líquida/peso corporal entre os grupos poderiam ter influenciado os resultados. Entretanto, não foram observadas diferenças consistentes na relação ingesta líquida/peso corporal ou no consumo de nicotina entre animais que receberam o tratamento combinado nicotina+etanol (grupo NIC+ETOH) e aqueles que receberam somente nicotina (grupo NIC). Examinados juntamente, nossos achados sustentam a suposição de que os resultados interativos de nicotina e etanol descritos no presente estudo não podem ser explicados por diferenças entre grupos na ingesta líquida/peso corporal ou pelo consumo de nicotina.

A despeito das peculiaridades desta cepa de camundongos, diferenças significativas entre grupos são observadas em nosso estudo. Este fato indica claramente que há aspectos fundamentais da neurobiologia destes animais que são diferentemente afetados pelo tratamento, o que deve ser esclarecido em futuras investigações. Por esta razão, estudos

futuros sobre as bases biológicas da interação entre etanol e nicotina são necessários e o uso de outras cepas de camundongos e espécies devem fornecer dados valiosos.

5.2. Efeitos da exposição na adolescência na memória/aprendizado

Estudos anteriores descrevem que a administração de nicotina na fase adulta causa uma melhora de curto prazo na performance cognitiva tanto em humanos como em roedores, com o pico dos efeitos vistos durante o tratamento (Ernst et al., 2001; Hefco et al., 2004; Levin & Rezvani, 2000; Rezvani & Levin, 2003), o que sugere que a melhora cognitiva exerce um papel na manutenção do hábito de fumar. É interessante que, em contraste, nossos resultados indicam que a exposição somente à nicotina durante a adolescência não promove benefícios cognitivos. De fato, animais expostos à nicotina apresentaram uma redução da capacidade cognitiva que se aproximava da significância. Recentemente, foi descrito que adolescentes fumantes têm um pobre desempenho em tarefas de memória operacional independente do momento em que o tabaco tenha sido utilizado anteriormente ao teste (Jacobsen et al., 2005). Estes resultados fornecem ainda mais evidências de que adolescentes apresentam uma resposta peculiar à nicotina quando comparados aos adultos (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004; Slotkin, 2000).

Em relação aos efeitos do etanol na memória, nossos resultados estão em acordo com estudos prévios que mostram uma deficiência no desempenho da tarefa da esQUIVA passiva quando a droga é aplicada antes de cada dia de teste (Bammer & Chesher, 1982), tendo sido sugerido que o etanol altera a atenção necessária ao processo de aprendizado por condicionamento (Steele-Russell et al., 2006) e a sensibilidade ao choque (Bammer & Chesher, 1982). Entretanto, foi demonstrado que a dose de etanol utilizada em nosso estudo não afeta a sensibilidade ao choque na intensidade escolhida para o teste (Gulick & Gould, 2007), sugerindo que o etanol não altera a aquisição, mas sim o processo de consolidação da memória/aprendizado. O que também pode ser reiterado no presente estudo é que os camundongos não estavam sob efeito agudo da droga durante as sessões de teste (Parnell et al., 2006), descartando a possibilidade de déficits motores atuarem como um viés de confundimento.

Em relação à dupla exposição, foi mostrado em adultos que o resultado da co-administração de nicotina e etanol representa a oposição do efeito cognitivo de uma droga em relação ao efeito da outra (Gould & Lommock, 2003; Rezvani & Levin, 2002, 2003; Tracy et al., 1999). Adicionalmente, a nicotina tem sido mostrada como uma inibidora da

neurotoxicidade induzida pelo etanol em cultura de células corticais e cerebelares (Tizabi et al., 2003, 2004). Apesar de estudos prévios demonstrarem um efeito benéfico da nicotina em contraste aos danos promovidos pelo etanol, no presente estudo, os efeitos do tratamento combinado refletiram a simples somação dos efeitos da exposição individual à nicotina e ao etanol, indicando que os efeitos deletérios na memória/aprendizado representam um pior resultado quando na dupla exposição durante a adolescência.

Desta maneira, nossos achados oferecem evidências de que a adolescência é uma janela crítica para a interação entre nicotina e etanol, com efeitos únicos quando comparados à idade adulta. Como resultado, é possível especular que, na exposição durante a adolescência, a associação do consumo de tabaco e de álcool não pode ser explicada pela ação da nicotina em reverter os danos causados pelo etanol na performance cognitiva.

5.3. Efeitos do curto período de retirada na memória/aprendizado

Como indicado pelo índice de memória/aprendizado, a exposição à nicotina durante a adolescência melhora a memória/aprendizado no curto período de retirada. Este resultado está de acordo com achados prévios de Trauth et al. (2000) onde uma melhora cognitiva foi encontrada no período pós-tratamento em ratos, indicando que, contrastando com a manutenção do fumo, a cessação do fumo não está associada a maiores prejuízos ao desempenho cognitivo de adolescentes. Por outro lado, foi mostrado recentemente por Jacobsen e colaboradores (2005) que adolescentes humanos que fumavam tabaco diariamente experimentavam deficiências agudas na memória verbal e recente durante a retirada da droga. As diferenças entre os estudos supracitados a respeito dos efeitos da nicotina na performance cognitiva devem refletir não apenas características espécie-específicas, mas também o fato do estudo de Jacobsen et al. (2005) ter testado adolescentes humanos durante uma retirada de 24 horas, enquanto que no presente estudo e no estudo de Trauth et al. (2000) foi usado um período mais longo de retirada da nicotina. Desta forma, é possível que alguns dias de retirada sejam necessários para que surjam as melhoras cognitivas induzidas pela nicotina associadas à exposição na adolescência.

Para o etanol, ainda que estudos prévios tenham mostrado que a exposição em ratos adolescentes, mas não em adultos, promove prejuízos persistentes na formação da memória (Barron et al., 2005; Sircar & Sircar, 2005), outros estudos mostram que a retirada de etanol durante a adolescência não afeta memória e aprendizagem (Popovic et al., 2004).

Nossos resultados seguem a linha dos achados de Popovic e colaboradores (2004) uma vez que a diminuição na performance cognitiva em camundongos tratados com etanol não alcança a significância durante o período de retirada. Esses achados sugerem mudanças reversíveis na memória/aprendizado e sugerem que adolescentes são menos sensíveis à deterioração na performance cognitiva promovida pela retirada do etanol. As diferenças entre nossos dados e aqueles de Barron et al. (2005) e de Sircar & Sircar (2005) podem, em parte, estar relacionados aos diferentes desenhos experimentais utilizados para avaliar memória e aprendizado: em contraste com estes estudos, no presente trabalho, os camundongos não estavam sob efeitos agudos do etanol durante os testes comportamentais.

Apesar de o grupo tratado com nicotina ter melhorado memória/aprendizado durante o curto período de retirada, a nicotina não promoveu um resultado semelhante quando combinada ao etanol. Este resultado corrobora dados prévios da literatura que contrastam efeitos cognitivos de nicotina e de etanol na fase adulta (Gould & Lommock, 2003; Rezvani & Levin, 2002, 2003; Tracy et al., 1999). Entretanto, apesar de alguns estudos já terem demonstrado a atividade neuroprotetora da nicotina em relação aos efeitos deletérios do etanol (Gould & Lommock, 2003; Prendergast et al., 2000; Tracy et al., 1999), não encontramos evidências de que a nicotina neutralize os efeitos negativos de etanol. Contrariamente, nossos resultados sugerem que a administração de etanol durante a adolescência bloqueia as melhoras promovidas pela nicotina na memória/aprendizado, embora o próprio etanol não tenha causado déficits. Desta forma, durante o curto período de retirada, a co-administração promoveu um pior resultado se comparada à exposição à nicotina somente.

5.4. Efeitos do longo período de retirada na memória/aprendizado

Em contraste aos efeitos promovidos por uma ou outra droga ao término do período de exposição e no curto período de retirada, os efeitos na memória/aprendizado causados tanto pela nicotina quanto pelo etanol não persistiram um mês após a exposição. É interessante que nossos resultados indicam que a nicotina não promoveu efeitos tardios, dado que estudos prévios tenham relatado que a melhora cognitiva promovida pela nicotina pode persistir por semanas ou meses após o tratamento com nicotina na adolescência (Trauth et al., 2000). Entretanto, estudos que observaram efeitos de longo prazo da nicotina quando administrada na adolescência utilizaram uma diferente via de administração da droga bem como um diferente programa de tratamento. Os déficits cognitivos decorrentes

do uso do etanol na adolescência aparentam ser dependentes do padrão de exposição, uma vez que períodos mais longos de tratamento com etanol (Farr et al., 2005) e com doses mais altas (White & Swartzwelder, 2004; Parsons & Nixon, 1998) causaram déficits permanentes e danos neuronais em roedores e em humanos.

Em oposição à falta de efeitos promovidos pela nicotina e pelo etanol separadamente, o índice de memória/aprendizado revelou que a co-administração das drogas melhorou a performance cognitiva somente em fêmeas um mês após a exposição revelando um efeito sinergista sexo-dependente da combinação de nicotina e etanol. De fato, estes resultados constituem a primeira evidência de que a dupla exposição durante a adolescência gera alterações cognitivas após um longo período de retirada.

Em vista da diferença entre sexos descrita acima, nossos resultados sugerem que fêmeas adolescentes são mais suscetíveis às alterações cognitivas induzidas pela nicotina e pelo etanol. Ainda que os mecanismos de interação entre nicotina e etanol não sejam totalmente compreendidos, o efeito sinergista em fêmeas sugere que ambas as drogas compartilham vias similares e/ou mecanismos de ação. Contudo, futuros estudos são necessários para determinar quais mudanças neuroquímicas estão associadas a este efeito comportamental sexo-dependente. Uma possibilidade é que tais efeitos somente em fêmeas sejam hormônio-dependentes (Dazzi et al., 2007; Tanapat et al., 1999). De fato, a plasticidade, a reciclagem de células neurais e, portanto, os efeitos dos agentes que afetam a replicação das células, a diferenciação e o conseqüente crescimento de neuritos são responsivos ao estrogênio (Tanapat et al., 1999). De fato, evidências indicam que a sensibilidade de primatas fêmeas não-humanas adultas aos efeitos subjetivos do etanol muda durante as diferentes fases do ciclo menstrual, como resultado de alterações nos níveis endógenos de hormônios ovarianos (Grant et al. 1997). Dado que a adolescência, período em que ambas as drogas foram administradas, é um momento em que os sistemas hormonais e neurais ainda estão em desenvolvimento em humanos e outras espécies de mamíferos, a investigação sobre as relações entre agentes estressores, estado afetivo e interações hormônios–neurotransmissor pode ser crucial para a compreensão destes resultados.

Estudos anteriores sugerem que a recaída ao uso de drogas seja devida à pior performance cognitiva durante a retirada quando comparada ao desempenho da tarefa durante a exposição (Heishman, 1999). Considerando a falta de efeitos durante o curto período de retirada de ambas as drogas (nicotina+etanol), a falta de efeitos persistentes em machos e a melhora da performance em camundongos fêmeas submetidas ao tratamento

combinado durante o longo período de retirada, é possível especular que a associação entre fumo e consumo de bebida alcoólica descrita nos estudos epidemiológicos (Carmody et al., 1985; Dawson, 2000; Di Franza & Guerrera, 1990; Grant, 1998; Larsson & Engel, 2004; Miller & Gold, 1998) possa não ser explicada pelos efeitos cognitivos cumulativos persistentes de nicotina e etanol. Se mudanças similares ocorrem durante a abstinência de bebida alcoólica e do fumo, os efeitos em aprendizagem e memória não são, provavelmente, os maiores fatores determinantes na recaída do uso combinado das drogas nicotina e etanol.

5.5. Efeitos na ansiedade

O fato de que a exposição combinada à nicotina+etanol durante a adolescência aumentou a defecação durante o primeiro contato com a caixa da esQUIVA passiva sugere alterações persistentes nas reações emocionais, as quais indicam aumento nos níveis de ansiedade. Diferentes paradigmas têm sido propostos para medir diferentes aspectos emocionais (Picciotto et al., 2002). De fato, os efeitos tardios ansiogênicos da co-exposição à nicotina e ao etanol durante a adolescência também foram vistos recentemente no labirinto em cruz elevado (Abreu-Villaça et al., 2008).

Estes resultados são corroborados por outro estudo que indica que baixas doses de nicotina afetam adversamente a extinção do comportamento de imobilidade de defesa (*freezing behavior*) em roedores (Smith et al., 2006), o que implica em altos níveis de ansiedade em animais expostos à nicotina quando comparados aos controles. É concebível que níveis alterados de ansiedade durante o primeiro contato com o teste possam confundir a análise do componente memória/aprendizado da tarefa. Entretanto, a análise do coeficiente de correlação entre B/min e PA1 bem como B/min e o índice de memória/aprendizado (PA2-PA1)/PA1 demonstra que não há associação entre estas variáveis. Estes achados indicam que os níveis de ansiedade durante o primeiro contato com a caixa de teste da esQUIVA passiva não afetam a avaliação do componente de memória/aprendizado da tarefa.

5.6. Efeitos neurobiológicos de nicotina e etanol

Evidências prévias indicam que os sistemas colinérgicos centrais imaturos envolvidos na aprendizagem, na memória e na resposta a psicoestimulantes (Mathews et

al., 1974; Nadler et al., 1974; Zahalka et al., 1993) são particularmente vulneráveis a estimulantes do sistema nervoso central como a nicotina (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004) e etanol (Heaton et al., 1996; Kristofikova et al., 2003). Embora haja evidências de que a nicotina afete outros sistemas neurotransmissores (Abreu-Villaça et al., 2003b; Dani & De Biasi, 2001; Trauth et al., 2001; Wonnacott et al., 2000), como um análogo a acetilcolina, os receptores nicotínicos colinérgicos são mediadores celulares primários dos efeitos desta droga (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004). Em relação ao etanol, esta droga influencia diretamente a função de vários canais iônicos incluindo receptores nicotínicos (Castaneda et al., 1996; Eckardt et al., 1998; Grant, 1994). De fato, tanto nicotina (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004; Flores et al., 1992) quanto etanol (Booker & Collins, 1997) promovem suprarregulação dos receptores colinérgicos nicotínicos em diversas regiões cerebrais. Além disso, foi demonstrado que o etanol modula a suprarregulação induzida pela nicotina nos receptores colinérgicos nicotínicos (Dohrman & Reiter, 2003), reforça o fluxo iônico induzido pelo agonista através dos receptores nicotínicos (Aistrup et al., 1999; Cardoso et al., 1999) e aumenta a estimulação dos receptores nicotínicos envolvidos na ativação do sistema mesolímbico dopaminérgico (Soderpalm et al., 2000). Estes achados indicam que o receptor nicotínico é um sítio no qual nicotina e etanol podem interagir.

O sistema dopaminérgico também tem sido apontado como um dos mediadores que mais influencia no aprendizado em tarefas de esquiva inibitória (Jaffard et al., 2001; Myhrer, 2003), visto que a memória recente (Davis et al., 1991) e a aquisição relacionada a estímulo-resposta (Rezayof et al., 2007) e a outros tipos de aprendizado (Di Chiari et al., 2004) é tida como dependente de receptores dopaminérgicos mesocorticolímbicos (Di Chiari et al., 2004; Mishkin et al., 1984; Packard & Knowton, 2002; Rezayof et al., 2007).

Davis e colaboradores (1991) demonstraram que a hipoatividade dopaminérgica no córtex pré-frontal leva a déficits de memória recente. Algo semelhante acontece pelo uso do etanol, que gera um bloqueio da produção dopaminérgica no córtex pré-frontal medial gerando déficits da memória espacial (De Oliveira & Nakamura-Palacios, 2003). Opostamente, a administração de nicotina na periadolescência produz um aumento da arborização dendrítica nos neurônios dopaminérgicos do núcleo acumbens com alterações estruturais persistentes (McDonald et al., 2005). De fato, em nosso estudo, durante o período de retirada, nicotina e etanol produziram efeitos opostos, a nicotina causando um efeito benéfico e o etanol revertendo este efeito. Estes resultados sugerem o envolvimento direto do sistema dopaminérgico nas alterações cognitivas observadas. Em vista da significativa plasticidade no córtex pré-frontal durante a adolescência (Sowell et al., 1999,

2001; Van Eden et al., 1990), fumar e/ou beber na adolescência constitui um risco para o desenvolvimento de funções cognitivas.

Além da ação de nicotina e etanol nestes sistemas neurotransmissores, a atuação do etanol na função de receptores ionotrópicos (Gonzales & Hoffman, 1991; Samson & Harris, 1992; Scivoletto & Malbergier, 2003; Zaleski et al., 2004) e da nicotina na modulação de outros neurotransmissores através da ativação dos nAChRs (Aramakis & Metherate, 1998; Chiodini et al., 1999; Levin & Simon, 1998; Miledi, 1980; Wonnacott, 1997; Yin & French, 2000) sugere ainda que, direta ou indiretamente, as alterações cognitivas encontradas neste estudo devidas à administração isolada de nicotina e de etanol e à dupla exposição também sejam devidas a modificações funcionais de receptores glutamatérgicos NMDA, sendo este um outro sítio de ação comum a estas drogas.

Neurônios NMDA hipocampais apresentam uma sensibilidade ao etanol idade-dependente, sendo maior em adolescentes do que em neonatos (Marinelli et al., 2005) ou em adultos (Swartzwelder et al., 1995; Li et al., 2002). Esta sensibilidade diferenciada em ratos adolescentes pode explicar porque o uso do etanol nesta fase do desenvolvimento é tão crítico para os processos de formação de memória com repercussões, mesmo após a retirada, na idade adulta. Além disso, o aumento da expressão e da função dos receptores NMDA em neurônios da amígdala de ratos após a ingestão crônica de etanol (Floyd et al., 2003) corrobora a evidência da participação dos receptores NMDA nos processos de memória amígdala dependentes, uma vez que o condicionamento pelo medo é facilitado após a retirada do etanol (Bertotto et al., 2006). Estas mudanças estruturais e funcionais encontradas em diferentes regiões cerebrais, incluindo áreas do sistema límbico, durante a exposição crônica e a retirada do tratamento com etanol (Floyd et al., 2003) reforçam o envolvimento dos receptores NMDA como mediador dos efeitos cognitivos no etanol.

Por outro lado, neurônios estriatais e corticais expostos aguda e cronicamente à nicotina apresentam uma redução dos efeitos citotóxicos do excesso de Ca^{2+} intracelular pela hiperativação do receptor NMDA (Akaike et al., 1994; Kaneko et al., 1997; Marin et al., 1994; Minana et al., 1998; Shimohama et al., 1996). Este dado é particularmente relevante ao considerarmos a hiperexcitação dos receptores NMDA e dos canais de cálcio com efeitos tóxicos devido à exposição crônica (Bao et al., 2001; Chandler et al., 1999; Follesa & Ticku, 1995, 1996; Kalluri et al., 1998) e à retirada do etanol em humanos, (Freund & Anderson, 1996; Geretsegger & Fartacek, 1998; Tsai et al., 1998) e em roedores (Becker et al., 1998; Sanna et al., 1993).

Ademais, embora estudos apontem o acetaldeído, um produto do metabolismo do etanol e também da queima de açúcares presentes nos cigarros, como um outro mediador dos efeitos de recompensa do tabaco (Belluzzi et al., 2005; Seeman et al., 2002; Talhout et al., 2007) e do etanol (Quertemont et al., 2005), ainda não há indícios esclarecedores da ação direta desta substância durante a co-administração de nicotina e etanol. Foi demonstrado que o acetaldeído inibe processos de aprendizagem, como a potencialização de longo prazo (Abe et al., 1999) e a consolidação da memória (Quertemont et al., 2004; Quertemont, 2004; Soderpalm et al., 2000). De alguma maneira, o acetaldeído pode potencializar a interação entre estas drogas, visto que o acetaldeído deve estimular os efeitos de recompensa da nicotina e do etanol enquanto inibe a aprendizagem.

Neste contexto, é provável que as funções cognitivas e os mecanismos de reforço de drogas não sejam apenas intimamente relacionados, mas também interligados (Lajtha, 2008; Soderstrom et al., 2007). Os mecanismos biológicos mediadores de recompensa e adição devem estar envolvidos como parte dos processos de aprendizagem e memória e vice versa. Porém, mais estudos são necessários para a melhor compreensão das funções de controle e mecanismos detalhados da interação dos dois processos.

Há, relativamente, poucos estudos animais sobre a base neurobiológica da exposição combinada à nicotina e ao etanol. Enquanto alguns estudos sugerem que a nicotina tem um efeito modulador sobre os efeitos do etanol através de sua ação colinérgica, outros não mostram interações marcantes e outros ainda mostram um aumento dos efeitos (Bachtell & Ryabinin, 2001; Penland et al., 2001; Tizabi et al., 2002, 2003). Adicionalmente, como descrito acima, ambas as drogas atuam em outros sistemas como o dopaminérgico (Di Chiara et al., 2004; Tsukada et al., 2005) e glutamatérgico (Quiang et al., 2007). O fato de ambos, nicotina e etanol, terem estes alvos comuns levanta a possibilidade de interações menos-que-aditivas ou sinérgicas entre os dois tratamentos. De fato, neste estudo identificamos um efeito sinérgico durante a retirada de longo prazo em fêmeas, quando a exposição combinada causou melhora na performance cognitiva. Uma vez que tem sido sugerido que receptores colinérgicos nicotínicos (Nordberg, 2001; Paterson & Nordberg, 2000), glutamatérgicos NMDA (Bertotto et al., 2006; Mameli et al., 2005) e dopaminérgicos (Davis et al., 1991; De Oliveira & Nakamura-Palacios, 2003; Rezayof et al., 2007) desempenham um papel relevante em processos cognitivos, como aprendizado e memória, o papel destes sistemas neurotransmissores nas alterações de memória/aprendizado associadas à exposição à nicotina e ao etanol durante a adolescência precisa ser mais bem avaliado em estudos posteriores.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo oferece evidência experimental da interação funcional entre nicotina e etanol na regulação de respostas comportamentais, particularmente, o comportamento cognitivo em camundongos adolescentes: ao final do período de exposição, nicotina e etanol provocam déficits cumulativos na memória/aprendizado. Durante um curto período de retirada, nicotina promove melhorias em memória/aprendizado, enquanto que a administração de etanol bloqueia os efeitos induzidos pela nicotina, embora ele próprio não cause déficits significativos. Finalmente, embora nem os efeitos da nicotina nem do etanol persistam um mês após a exposição (PN74-75), o uso associado de nicotina e etanol durante a adolescência promove uma melhora tardia na memória/aprendizado evidente em fêmeas.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que a exposição isolada a nicotina e ao etanol causam danos cognitivos no adolescente e que estes efeitos prejudiciais são mais severos quando ocorre a exposição combinada a estas drogas. Entretanto, os efeitos negativos da exposição combinada não persistem durante a retirada. De fato, a exposição combinada promove um efeito benéfico tardio sexo-dependente na memória/aprendizado durante um longo período de retirada.

A falta de vantagens funcionais durante a exposição combinada sugere que, se efeitos similares ocorressem em humanos adolescentes durante o co-abuso do tabaco e do etanol ou durante a retirada, os efeitos em memória/aprendizado não seriam o principal fator determinante para o consumo combinado durante a adolescência.

Nossos resultados sugerem que a adolescência é o melhor momento para se implementar medidas intervencionistas em prol da cessação do consumo destas drogas de abuso, uma vez que a exposição restrita a este período, em contraste com a exposição na fase adulta, não causa prejuízos cognitivos persistentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE K, YAMAGUCHI S, SUGIURA M, SAITO H. The ethanol metabolite acetaldehyde inhibits the induction of long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 1999; 127: 1805-1810.
- ABREU-VILLAÇA Y, NUNES F, do E QUEIROZ-GOMES F, MANHÃES AC, FILGUEIRAS CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, 2008; 33(3): 599-610.
- ABREU-VILLAÇA Y, MEDEIROS AH, LIMA CS, FARIA FP, FILGUEIRAS CC, MANHÃES AC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. *Behav. Brain. Res.*, 2007; 181: 136-146.
- ABREU-VILLAÇA Y, NUNES F, MEDEIROS AH, FARIA FP, QUEIROZ-GOMES FE, C.S. L, FILGUEIRAS CC, MANHÃES AC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: Anxiety and memory effects. *Soc. Neurosci. Abstr.*, Atlanta, US, 2006.
- ABREU-VILLAÇA Y, QUEIROZ-GOMES FE, DAL MONTE AP, FILGUEIRAS CC, MANHÃES AC. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57Bl/6 mice. *Behav. Brain Res.*, 2006; 167: 175-182.
- ABREU-VILLAÇA Y, SEIDLER F, SLOTKIN TA. Does Prenatal Nicotine Exposure Sensitize the Brain to Nicotine-Induced Neurotoxicity in Adolescence? *Neuropsychopharmacology*, 2004; 29: 1440-1450.
- ABREU-VILLAÇA Y, SEIDLER FJ, QIAO D, TATE CA, COUSINS MM, THILLAI I, SLOTKIN TA. Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Neuropsychopharmacology*, 2003a; 28: 1935-1949.
- ABREU-VILLAÇA Y, SEIDLER FJ, SLOTKIN TA. Impact of adolescent nicotine exposure on adenylyl cyclase-mediated cell signaling: enzyme induction, neurotransmitter-specific effects, regional selectivities, and the role of withdrawal. *Brain Res.*, 2003b; 988: 164- 172.
- ABREU-VILLAÇA Y, SEIDLER FJ, TATE CA, COUSINS MM, SLOTKIN TA. Prenatal Nicotine Exposure Alters the Response to Nicotine Administration in Adolescence: Effects on Cholinergic Systems during Exposure and Withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, 2004; 29: 879-890.
- ABREU-VILLAÇA Y, SEIDLER FJ, TATE CA, SLOTKIN TA. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Res.*, 2003; 979: 114-128.
- ADINOFF B. Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harv. Rev. Psychiatry*, 2004; 12: 305-320.
- 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, GRANSTREM O, MACRI S, IZYKENOVA G, DAMBINOVA S, LAVIOLA G. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology*, 2004; 29: 869-878.
- 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, MACRÌ S, PACIFICI R, LAVIOLA G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology*, 2002; 27(2): 212-224.
- AISTRUP GL, MARSZALEC W, NARAHASHI T. Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.*, 1999; 55: 39-49.
- AKAIKE A, TAMURA Y, YOKOTA T, SHIMOHAMA S, KIMURA J. Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against n-methyl-d-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res.*, 1994; 644: 181-187.
- ALTMAN J, BAYER SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.*, 1990; 301: 365-381.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1994.
- ANDERSEN SL. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2003; 27: 3-18.
- ARAMAKIS VB, METHERATE R. Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 8485-8495.
- ARNETT J. Reckless behavior in adolescence: A developmental perspective. *Devel. Rev.*, 1992; 12: 339-373.
- ARNETT JJ. Adolescent storm and stress, reconsidered. *The American Psychologist*, 1999; 54: 317-326.
- BACHTELL RK, RYABININ AE. Interactive effects of nicotine and alcohol co-administration on expression of inducible transcription factors in mouse brain. *Neuroscience*, 2001; 103: 941-954.
- BALFOUR DJ. The effects of nicotine on brain neurotransmitter systems. *Pharmacol. Ther.*, 1982; 16: 269-282.
- BALFOUR DJ, FAGERSTROM KO. Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders. *Pharmacol. Ther.*, 1996; 72: 51-81.
- BAMMER G, CHESHER GB. An analysis of some effects of ethanol on performance in a passive avoidance task. *Psychopharmacology*, 1982; 77(1): 66-73.
- BAO X, HUI D, NAASSILA M, MICHAELIS EK. Chronic ethanol exposure increases gene transcription of subunits of an N-methyl-D-aspartate receptor-like complex in cortical neurons in culture. *Neurosci Lett.*, 2001; 315(1-2): 5-8.
- BARDO MT, DWOSKIN LP. Biological connection between novelty- and drug-seeking motivational systems. *Nebr Symp Motiv*, 2004; 50: 127-158.
- BARRON S, WHITE A, SWARTZWELDER HS, BELL RL, RODD ZA, SLAWECKI CJ, EHLERS CL, LEVIN ED, REZVANI AH, SPEAR LP. Adolescent vulnerabilities to chronic alcohol or nicotine exposure: Findings from rodent models. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005; 29: 1720-1725.

- BARTECCHI CE, MACKENZIE TD, SCHRIER RW. The Global Tobacco Epidemic. *Scientific American*, May, 1995.
- BASAR E. Memory and brain dynamics: oscillations integrating attention, perception, learning, and memory CRC PRESS, 2004; 7. Boca Raton London New York Washington, D.C., apud ROSE 1997.
- BAU CHD. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. *Ciência & Saúde Coletiva* 2002; 7(1): 183-190.
- BAUMRIND D. A developmental perspective on adolescent risk taking in contemporary America. In: Irwin Jr. CE, editor. *Adolescent social behavior and health*, San Francisco, CA: Jossey-Bass, 1987: 93-125.
- BAYDAS G, YASAR A, MEHMET TUZCU M. Comparison of the impact of melatonin on chronic ethanol-induced learning and memory impairment between young and aged rats. *J. Pineal Res.* 2005; 39: 346-352.
- BAYER SA. [3H]Thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp. Brain Res.*, 1983; 50: 329-340.
- BAYER SA, YACKEL JW, PURI PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, 1982; 216: 890-892.
- BECKER HC, VEATCH LM, DIAZ-GRANADOS JL. Repeated ethanol withdrawal experience selectively alters sensitivity to different chemoconvulsant drugs in mice. *Psychopharmacology*, 1998; 139:145-153.
- BENOWITZ NL, PORCHET H, SHEINER L, JACOB P III. Nicotine absorption and cardiovascular effects with smokeless tobacco use: Comparison with cigarettes and nicotine gum. *Clin Pharmacol Ther*, 1988; 44: 23-28.
- BERKE JD, HYMAN SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, 2000; 25: 515-532.
- BERTOTTO ME, BUSTOS SG, MOLINA VA, MARTIJENA ID. Influence of ethanol withdrawal on fear memory: effect of d-cycloserine. *Neuroscience*, 2006; 142: 979–990.
- BINNIE V, MCHUGH S, MACPHERSON L, BORLAND B, MOIR K, MALIK K. The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine. *Oral Dis*, 2004; 10: 287-293.
- BLOOMFIELD K, STOCKWELL T, GMEL G, REHN N. International Comparisons of Alcohol Consumption. *Alcohol Research & Health*, 2003; 27(1): 95-109.
- BLUM K, BRAVERMAN ER, HOLDER JM, LUBAR JF, MONASTRA VJ, LUBAR JO, CHEN TJ, COMINGS DE. Reward deficiency syndrome: a biogenetic model for the diagnosis and treatment of impulsive, addictive, and compulsive behaviors. *J Psychoactive Drugs*, 2000; 32 Suppl:i-iv, 1-112.
- BOBO JK, HUSTEN C. Sociocultural Influences on Smoking and Drinking. *Alcohol Research & Health*, 2000; 24(4): 225-232.
- BOOKER TK, COLLINS AC. Long-term ethanol treatment elicits changes in nicotinic receptor binding in only a few brain regions. *Alcohol*, 1997; 14: 131-140.
- BRODY AL, MANDELKERN MA, LONDON ED, OLMSTEAD RE, FARAHI J, SCHEIBAL D, JOU J, ALLEN V, TIONGSON E, CHEFER SI, KOREN AO, MUKHIN AG. Cigarette smoking saturates brain alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *Archives of General Psychiatry*, 2006; 63: 907-915.

- BUISSON B, BERTRAND D. Chronic exposure to nicotine upregulates the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor function. *The Journal of Neuroscience*, 2001, 21(6): 1819-1829.
- BUISSON B, BERTRAND D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002; 23(3): 130:136.
- BURLING TA, ZIFF DC. Tobacco smoking: a comparison between alcohol and drug abuse inpatients. *Addictive behaviors*, 1988; 13:185-90.
- CARABALLO RS, GIOVINO GA, PECHACEK TF. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine Tob Res*, 2004; 6: 19-25.
- CARDOSO RA, BROZOWSKI SJ, CHAVEZ-NORIEGA LE, HARPOLD M, VALENZUELA CF, HARRIS RA. Effects of ethanol on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999; 289: 774-780.
- CARMODY TP, BRISCHETTO CS, MATARAZZO JD, O'DONNELL RP, CONNOR WE. Co-occurrent use of cigarettes, alcohol, and coffee in healthy, community-living men and women. *Health Psychol*, 1985; 4: 323-335.
- CARPENTER-HYLAND EP, WOODWARD JJ, CHANDLER LJ. Chronic ethanol induces synaptic but not extrasynaptic targeting of NMDA receptors. *J Neurosci.*, 2004; 24(36):7859-7868.
- CASTANEDA R, SUSSMAN N, WESTREICH L, LEVY R, O'MALLEY M. A review of the effects of moderate alcohol intake on the treatment of anxiety and mood disorders. *J Clin Psychiatry*, 1996; 57: 207-212.
- ÇELİK T, ÇAKIR E, KAYIR H, BILGI C, UZBAY T. The effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on passive avoidance task and serum cholinesterase level in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005; 29: 505-509.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Tobacco use among high school students from United States, 1997. *Morbid Mortal Weekly Rep.*, 1998; 47: 229-233.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trends in cigarette smoking among high school students: United States, 1991-1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2000; 49: 755-758.
- CHAMBERS RA, TAYLOR JR, POTENZA MN. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *The American Journal of Psychiatry*, 2003; 160: 1041-52.
- CHANDLER LJ, NORWOOD D, SUTTON G. Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol Clin Exp Res.*, 1999; 23(2): 363-370.
- CHATTERJI S, SAUNDERS JB, VRASTI R, GRANT BF, HASIN D, MAGER D. Reliability of the alcohol and drug modules of the Alcohol Use Disorder and Associated Disabilities Interview Schedule—Alcohol/Drug-Revised (AUDADIS—ADR): An international comparison. *Drug & Alcohol Dependence*, 1997; 47: 171-185.
- CHEN J, MILLAR WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep.*, 1998; 9: 39-46.
- CHEN WJ, HARLE LK. Interactive effect of alcohol and nicotine on developing cerebellum: an investigation of the temporal pattern of alcohol and nicotine administration. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005; 29: 437-442.

- CHIODINI FC, TASSONYI E, HULO S, BERTRAND D, MULLER D. Modulation of synaptic transmission by nicotine and nicotinic antagonists in hippocampus, *Brain Res. Bull.*, 1999; 48: 623-638.
- COLLINS AC, BURCH JB, DE FIEBRE CM, MARKS MJ. Tolerance to and cross tolerance between ethanol and nicotine. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988; 29: 365-373.
- CRABBE JC, PHILLIPS TJ, BUCK KJ, CUNNINGHAM CL, BELKNAP JK. Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. *Trends Neurosci*, 1999; 22: 173-179.
- CRAWLEY JN, BELKNAP JK, COLLINS A, CRABBE JC, FRANKEL W, HENDERSON N, HITZEMANN RJ, MAXSON SC, MINER LL, SILVA AJ, WEHNER JM, WYNshaw-BORIS A, PAYLOR R. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997; 132: 107-24.
- CREWS F, HE J, HODGE C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2007; 86: 189-199.
- CUNNINGHAM MG, BHATTACHARYYA S, BENES FM. Amygdalocortical sprouting continues into early adulthood: implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. *J Comp Neurol.*, 2002; 453: 116-130.
- DA SILVA CAR. Composição química da fumaça do cigarro. *Jorn. Bras. Pneumol.*, 2004; 30(2): S8-S10.
- DANI JA, DE BIASI M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2001; 70: 439-46.
- DANI JA, HEINEMANN S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse, *Neuron*, 1996; 16: 905-908.
- DANI JA, JI D, ZHOU FM. Synaptic plasticity and nicotine addiction. *Neuron*, 2001; 31: 349-352.
- DANI JA. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system, *Biol. Psychiatry*, 2001; 49: 166-174.
- DAVIS KL, KAHN RS, KO G, DAVIDSON M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiat.*, 1991; 148: 1474-1486.
- DAVIS TJ, DE FIEBRE CM. Alcohol's actions on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Alcohol Research & Health*, 2006; 29(3): 179-185.
- DAWSON DA. Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend*, 2000; 59: 235-249.
- DAZZI L, SEU E, CHERCHI G, BARBIERI PP, MATZEU A, BIGGIO G. Estrous cycle-dependent changes in basal and ethanol-induced activity of cortical dopaminergic neurons in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 2007; 32: 892-901.
- DE FIEBRE NC, DE FIEBRE CM. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor knockout selectively enhances ethanol-, but not β -amyloid-induced neurotoxicity. *Neuroscience Letters*, 2005; 373:42-47.
- DE OLIVEIRA RW, NAKAMURA-PALACIOS EM. Haloperidol increases the disruptive effect of alcohol on spatial working memory in rats: a dopaminergic modulation in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*, 2003; 170(1): 51-61.
- DI CHIARA G, BASSAREO V, FENU S, DE LUCA MA, SPINA L, CADONI C, ACQUAS E, CARBONI E, VALENTINI V, LECCA D. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 2004; 47(1): 227-41.

- DIAMOND A. Guidelines for the study of brain-behavior relationships during development. In: LEVIN HS, EISENBERG HM e BENTON AL (Eds) Frontal lobe function and dysfunction, New York: Oxford Univ. Press, 1991. PP. 339-378.
- DIANA M, GESSA GL, ROSSETTI ZL. Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of dopamine mesolimbic system. *Alcohol Alcohol*, 1992; 2(4): 329-33.
- DIERKER L, LLOYD-RICHARDSON E, STOLAR M, FLAY B, TIFFANY S, COLLINS L, BAILEY S, NICHTER M, NICHTER M, CLAYTON R; THE TOBACCO ETIOLOGY RESEARCH NETWORK (TERN). The proximal association between smoking and alcohol use among first year college students. *Drug and Alcohol Dependence*, 2006; 81: 1-9.
- DIFRANZA JR, GUERRERA MP. Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol*, 1990; 51: 130-135.
- DOHRMAN DP, REITER CK. Ethanol modulates nicotine-induced upregulation of nAChRs. *Brain Res*, 2003; 975: 90-98.
- DOMINO EF. Tobacco smoking and nicotine neuropsychopharmacology: some future research directions. *Neuropsychopharmacology*, 1998; 18(6): 456-468.
- DRAGANSKI B, GASER C, BUSCH V, SCHUIERER G, BOGDAHN U, MAY A. Neuroplasticity: changes in grey matter induced by training. *Nature*, 2004; 427: 311-2.
- DREHER KF, FRASER JG. Smoking habits of alcohol outpatients. *Int J Addict*, 1967; 2: 259-68.
- DUBAS, JS. Cognitive abilities and physical maturation. In: LERNER R.M., PETERSEN, A.C. e BROOKS-GUNN, J. (Eds.) *Encyclopedia of adolescence*, Vol. 1, New York: Garland, 1991. pp.133-138.
- DURSTON S, HULSHOFF POL HE, CASEY BJ, GIEDD JN, BUITELAAR JK, VAN ENGELAND H. Anatomical MRI of the developing human brain: what have we learned? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2001; 40: 1012-1020.
- ECKARDT MJ, FILE SE, GESSA GL, GRANT KA, GUERRI C, HOFFMAN PL, KALANT H, KOOB GF, LI TK, TABAKOFF B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998; 22: 998-1040.
- EDENBERG HJ, KRANZLER HR. The contribution of genetics to addiction therapy approaches. *Pharmacol Ther.*, 2005; 108(1): 86-93.
- EILER WJ 2ND, JUNE HL. Blockade of GABA(A) receptors within the extended amygdala attenuates D(2) regulation of alcohol-motivated behaviors in the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats. *Neuropharmacology*, 2007; 52(8): 1570-9.
- EL GOYHEN AB, JOHNSON DS, BOUTLER J, VETTER DE, HEINEMANN S. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*, 1994; 79: 705-15.
- EL GOYHEN AB, VETTER DE, KATZ E, ROTHLIN CV, HEINEMANN S. Alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proceedings of the National Academy Science USA*, 2001; 98: 3501-6.
- ELDERS MJ, PERRY CL, ERIKSEN MP, GIOVINO GA. The report of the Surgeon General: preventing tobacco use among young people. *Am J Public Health* 1994; 84(4): 543-547.
- ERNST M, HEISHMAN SJ, SPURGEON L, LONDON ED. Smoking history and nicotine effects on cognitive performance. *Neuropsychopharmacology*, 2001; 25: 313-319.
- EVERITT BJ, WOLF ME. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 3312-3320.

- FAGERSTRÖM K. Epidemiologia do fumo – Consequências na Saúde e Benefícios da Cessação. *Drugs*, 2002; 62 (2): 1-9.
- FALK DE, YI HY, HILLER-STURMHÖFEL S. An epidemiologic analysis of co-occurring alcohol and tobacco use and disorders. *Alcohol Research & Health*, 2006; 29(3): 162-171.
- FARR SA, SCHERRER JF, BANKS WA, FLOOD JF, MORLEY JE. Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005; 29: 971-982.
- FENSTER CP, WHITWORTH TL, SHEFFIELD EB, QUICK MW, LESTER RA. Upregulation of surface $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *The journal of neuroscience*, 1999; 19: 4804-4814.
- FERREIRA VMM, MORATO GS. D-Cycloserine blocks the effects of ethanol and HA-906 in rats tested in the elevated plus-maze. *Alcohol Clin Exp Res.*, 1997; 21:9:1638-42.
- FERREIRA, ABH. Miniaurélio: o minidicionário da língua portuguesa. 6. ed. Positivo, 2006.
- FISHER LB, MILES IW, AUSTIN SB, CAMARGO JR. CA, COLDITZ GA. Predictors of Initiation of Alcohol Use Among US Adolescents Findings From a Prospective Cohort Study. *Arch Pediatr Adolesc Med.*, 2007; 161(10): 959-966.
- FLORES CM, ROGERS SW, PABREZA LA, WOLFE BB, KELLAR KJ. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of $\alpha 4$ and $\alpha 2$ subunits and is upregulated by chronic nicotine treatment. *Mol. Pharmacol.*, 1992; 41: 31-37.
- FLOYD DW, JUNG KY, MCCOOL BA. Chronic ethanol ingestion facilitates N-methyl-D-aspartate receptor function and expression in rat lateral/basolateral amygdala neurons. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2003; 307: 1020-1029.
- FODDAI M, DOSIA G, SPIGA S, DIANA M. Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology*, 2004; 29(3): 530-6.
- FOLLESA P, TICKU MK. Chronic ethanol treatment differentially regulates NMDA receptor subunit mRNA expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.*, 1995; 29(1): 99-106.
- FOLLESA P, TICKU MK. Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture. *J Biol Chem.*, 1996; 271(23): 13297-13299.
- FREUND G, ANDERSON KJ. Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.*, 1996; 20: 1165-1172.
- GADDNAS H, PIETILA K, AHTEE L. Effects of chronic oral nicotine treatment and its withdrawal on locomotor activity and brain monoamines in mice. *Behav Brain Res.*, 2000: 113.
- GADDNAS H, PIETILA K, PIEPPONEN TP, AHTEE L. Enhanced motor activity and brain dopamine turnover in mice during long-term nicotine administration in the drinking water. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2001; 70: 497-503.
- GALDURÓZ JCF, NOTO AR, FONSECA AM, CARLINI EA. V Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras. Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas – CEBRID/UNIFESP, 2004.
- GALVÃO JF, MOREAU RLM. Fundamentos de toxicologia – parte 4: Toxicologia social e medicamentos, 4.7. Tabaco. Seizi Oga, 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003; 297-306.

- GERDEMAN GL, PARTRIDGE JG, LUPICA CR, LOVINGER DM. It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 2003; 26(4): 184-192.
- GERETSEGGER C, FARTACEK R. Infusional high-dose application of the calcium-channel- blocking and ant glutamatergic agent caroverine in the treatment of alcohol withdrawal (DSM-111-R 291.80). *Eur Neuropsychopharmacol.*, 1998; 8: 191-194.
- GILBERTSON RJ, BARRON S. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005; 81: 54-64.
- GILMAN AG, GOODMAN LS, RALL T, MURAD F. Goodman & Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics* – 11. ed. McGraw-Hill, 2006.
- GIVENS B. Effect of ethanol on sustained attention in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997; 129: 135-140.
- GIVENS B, MCMAHON K. Effects of ethanol on nonspatial working memory and attention in rats. *Behav Neurosci*, 1997; 111: 275-282.
- GOGTAY N, GIEDD JN, LUSK L, HAYASHI KM, GREENSTEIN D, VAITUZIS AC, NUGENT TF 3RD, HERMAN DH, CLASEN LS, TOGA AW, RAPOPORT JL, THOMPSON PM. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 8174-8179.
- GOLDMAN L, WINGET C, HOLLINGSHEAD GW, LEVINE S. Postweaning development of negative feedback in the pituitary–adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology*, 1973; 12: 199-211.
- GONZALES RA, HOFFMAN PL. Receptor-gated ion channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991; 12: 1-3.
- GOULD E, WOOLF NJ, BUTCHER LL. Postnatal development of cholinergic neurons in the rat: I. Forebrain. *Brain Res Bull.*, 1991; 27:767-89.
- GOULD TJ, LOMMOCK JA. Nicotine enhances contextual fear conditioning and ameliorates ethanol-induced deficits in contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*, 2003; 117: 1276-1282.
- GRANT BF. Age at smoking onset and its association with alcohol consumption and DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the national longitudinal alcohol epidemiologic survey. *J. Substance Abuse*, 1998; 10: 59-73.
- GRANT BF. The impact of a family history of alcoholism on the relationship between age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol dependence: Results of the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *Alcohol Health & Research World*, 1998; 22: 144-147.
- GRANT KA, AZAROV A, SHIVELY CA, PURDY RH. Discriminative stimulus effects of ethanol and 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one in relation to menstrual cycle phase in cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *Psychopharmacology*, 1997; 130: 59-68.
- GRANT KA. Emerging neurochemical concepts in the actions of ethanol at ligand- gated ion channels. *Behav. Pharmacol.*, 1994; 5: 383-404.
- GRANT KA, VALVERIUS P, HUDSPITH M, TABAKOFF B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur J Pharmacol.*, 1990; 176(3): 289-296.
- GUERRA MP. A abstenção tabágica: Reflexões sobre a recaída. *Análise Psicológica*, 2004; 3 (XXII): 507-518.

- GULICK D, GOULD TJ. Acute ethanol has biphasic effects on short- and long- term memory in both foreground and background contextual fear conditioning in C57Bl/6 mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2007; 31(9): 1528-1537.
- GULYA K, GRANT KA, VALVERIUS P, HOFFMAN PL, TABAKOFF B. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res.*, 1991; 547(1): 129-134.
- HEATON MB, SWANSON DJ, PAIVA M, WALKER DW. Influence of prenatal ethanol exposure on cholinergic development in the rat striatum. *J Comp Neurol.*, 1996; 364: 113-20.
- HEFCO V, YAMADA K, HEFCO A, HRITCU L, TIRON A, NABESHIMA T. The interaction between the cholinergic and dopaminergic system in learning and memory process in rats. *Rom J Physiol*, 2004; 41: 21-30.
- HEISHMAN SJ. Behavioral and cognitive effects of smoking: relationship to nicotine addiction. *Nicotine Tob Res*, 1999; 1: S143-147; discussion S165-146.
- HIGLEY JD, SUOMI SJ, LINNOILA M. A nonhuman primate model of type II alcoholism? Part 2. Diminished social competence and excessive aggression correlates with low cerebrospinal fluid 5hydroxyindoleacetic acid concentrations. *Alcoholism: Clinical and Experimental Res.*, 1996; 20: 643-650.
- HISAOKA M, LEVY G. Kinetics of drug action in disease states XI: effect of nicotine on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of phenobarbital and ethanol in rats. *J Pharm Sci*, 1985; 74: 412-415.
- HODGES H, ALLEN Y, SINDEN J, MITCHELL SN, ARENDT T, LANTOS PL, GRAY JA. The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich fetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats. *Behav. Brain. Res.*, 1991; 43: 7-28.
- HOFFMAN PL, RABE CS, MOSES F, TABAKOFF B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem*, 1989; 52(6): 1937-1940.
- 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.
- HUNT PS, HOLLOWAY JL, SCORDALAKES EM. Social interaction with an intoxicated sibling can result in increased intake of ethanol by periadolescent rats. *Developmental Psychobiology*, 2001; 38:101-109.
- HUTTENLOCHER PR. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychology*, 1990; 28: 517-527.
- HUTTENLOCHER PR. Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *Am J Ment Defic.*, 1984; 88: 488-96.
- HYMAN SE, MALENKA RC. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001; 2: 695-703.
- INOUE Y, YAO L, HOPF FW, FAN P, JIANG Z, BONCI A, DIAMOND I. Nicotine and ethanol activate protein kinase A synergistically via G(i) betagamma subunits in nucleus accumbens/ventral tegmental cocultures: the role of dopamine D(1)/D(2) and adenosine A(2A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2007; 322(1): 23-9.
- INSTITUTO MÉDICO LEGAL DE SÃO PAULO (IML – SP), 1999. Arquivo CISA (Centro de Informações Sobre Saúde e Álcool). Disponível no site: <http://www.cisa.org.br/categoria.html?FhIdCategoria=b58109a471985691cdb64d146b951d4a>

- JACOBSEN LK, KRYSTAL JH, MENCL WE, WESTERVELD M, FROST SJ, PUGH KR. Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco smokers. *Biol. Psychiatry.*, 2005; 57: 56-66.
- JACOBSEN LK, MENCL WE, CONSTABLE RT, WESTERVELD M, PUGH KR. Impact of smoking abstinence on working memory neurocircuitry in adolescent daily tobacco smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, 2007; 193(4): 557-66.
- JAFFARD R, BONTEMPI B, MENZAGHI F. Chapter 17. Theoretical and practical considerations for the evaluation of learning and memory in mice. In: Buccafusco JJ editor, *Methods & new frontiers in neuroscience series*. CRC Press. Boca Raton London New York Washington, D.C., 2001.
- JAFFARD R, MEUNIER M. Role of the hippocampal formation in learning and memory. *Hippocampus*, 1993; S3, 203.
- JOHNSTON LD, O'MALLEY PM, BACHMAN JG. National Survey Results on Drug Use from the Monitoring the Future Study, 1975-2000. NIH Publication No. 01-4924, Bethesda, MD: Department of Health and Human Services, 2001; 1.
- KALLURI HS, MEHTA AK, TICKU MK. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. *Brain Res Mol Brain Res.*, 1998; 58 (1-2): 221-224.
- KALSBECK A, VOORN P, BUIJS RM, POOL CW, UYLINGS HB. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol.*, 1988; 269: 58-72.
- KANDEL E, SCHAWRTZ JH, JESSEL TM. *Principals of neural science* – 4. ed. Mc Graw Hill, 2000.
- KANEKO A, MAEDA T, KUME T, KOCHIYAMA H, AKAIKE A, SHIMOHAMA S, KIMURA J. Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via $\alpha 7$ -neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res.*, 1997; 765: 135-140.
- KAPLAN HI, SADOCK BJ, GREBB JAA. *Synopsis of psychiatry*, 1994. 7. ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1257pp.
- KELLY SJ, BONTHIUS DJ, WEST JR. Developmental changes in alcohol pharmacokinetics in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1987; 11: 281-286.
- KIANMAA K, TABAKOFF B. Neurochemical correlates of tolerance and strain differences in the neurochemical effects of ethanol. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1983; 18: 383-8.
- KIRCHENTEJN C, CHATKIN JM. Dependência da nicotina. *Jorn. Bras. Pneumol.*, 2004; 30(2): S11-S18.
- KLEIN LC, STINE MM, PFAFF DW, VANDENBERGH DJ. Maternal nicotine exposure increases nicotine preference in periadolescent male but not female C57B1/6J mice. *Nicotine Tobacco Res.*, 2003; 5: 117-124.
- KLEIN LC, STINE MM, VANDENBERGH DJ, WHETZEL CA, KAMENS HM. Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2004; 78: 13-25.
- KOELEGA HS. Alcohol and vigilance performance: a review. *Psychopharmacology (Berl)*, 1995; 118: 233-249.
- KOOB GF, LE MOAL M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 2001; 24, 97-129.

- KOOB GF, ROBERTS AJ, SCHULTEIS G, PARSONS LH, HEYSER CJ, HYYTIA P, MERLO-PICH E, WEISS F. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1998; 22: 3-9.
- KORKOSZ A, ZATORSKI P, TARACHA E, PLAZNIK A, KOSTOWSKI W, BIENKOWSKI P. Effects of ethanol on nicotine-induced conditioned place preference in C57BL/6J mice. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2006; 30: 1283-1290.
- KOSHIBU K, LEVITT P, AHRENS ET. Sex-specific, postpuberty changes in mouse brain structures revealed by threedimensional magnetic resonance microscopy. *Neuroimage*, 2004; 22: 1636-1645.
- KOSTOVIC I. Structural and histochemical reorganization of the human prefrontal cortex during perinatal and postnatal life. *Prog Brain Res.*, 1990; 85: 223-40.
- KOTA D, MARTIN BR, ROBINSON SE, DAMAJ MI. Nicotine dependence and reward differ between adolescent and adult male mice. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2007; 322(1): 399-407.
- KRISTOFIKOVA Z, PLATILOVA V, KLASCHKA J. Age- and sex-dependent effects of ethanol on hippocampal hemicholinium-3 sensitive choline carriers during postnatal development of rats. *Neurochem Res.*, 2003; 28: 397-405.
- LAD PJ, SCHENK DB, LEFFERT HL. Inhibitory monoclonal antibodies against rat liver alcohol dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1984; 235: 589-595.
- LAJTHA A. Interrelated mechanisms in reward and learning. *Neurochem. Int.*, 2008; 52 (1-2): 73-9.
- LANDRIGAN PJ, SCHECHTER CB, LIPTON JM, FAHS MC, SCHWARTZ J. Environmental pollutants and costs for lead poisoning, asthma, cancer and developmental disabilities. *Environ. Health Perspect.*, 2002; 110: 721-728.
- LARANJEIRA R, PINSKY I, ZALESKI M, CAETANO R. I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS, 2007. Disponível em: <http://www.obid.senad.gov.br>
- LARSSON A, ENGEL JA. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2004; 27: 713-720.
- LATHE R. Hormone and hippocampus. *J Endocrinol.*, 2001; 169:205-31.
- LEBARGY F. Biologia da Nicotina. In Yves Martinet & Abraham Bohadana (Eds.), *O Tabagismo – Da prevenção à abstinência*, 2003; 91-96. Lisboa: Climepsi.
- LEISCHOW S, VALENTE S, HILL A, OTTE P, AICKIN M, HOLDEN T, KLIGMAN E, COOK, G. Effects of nicotine dose and administration method on withdrawal symptoms and side effects during short-term smoking abstinence. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 1997; 5 (1): 54-64.
- LEONARD S, BERTRAND D. neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine & Tobacco Research*, 2001; 3: 203-23.
- LEVIN ED, MCCLERNON FJ, REZVANI AH. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006; 184(3-4): 523-539.
- LEVIN ED, REZVANI AH. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol*, 2000; 393: 141-146.
- LEVIN ED, SIMON B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*, 1998; 138: 217-230.

- LI Q, WILSON WA, SWARTZWELDER HS. Differential effect of ethanol on NMDA EPSCs in pyramidal cells in the posterior cingulate cortex of juvenile and adult rats. *J Neurophysiol.*, 2002; 87: 705-711.
- LIEBER CS. Alcohol and the liver: Metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt. Sinai J. Med.*, 2000; 67: 84-94.
- LINDSTROM J, ANAND R, GERZANICH V, PENG X, WANG F, WELLS G. Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Progress In Brain Research*, 1996; 109: 125-37.
- LITTLE HJ. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol Research & Health*, 2000; 24(4): 215-224.
- LITTLE PJ, KUHN CM, WILSON WA, SWARTZWELDER, HS. Differential effects of ethanol in adolescent and adult rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1996; 20:1346–1351.
- LÓPEZ-MORENO JA, TRIGO-DÍAZ JM, RODRÍGUEZ DE FONSECA F, GONZÁLEZ CUEVAS G, GÓMEZ DE HERAS R, CRESPO GALÁN I, NAVARRO M. Nicotine in alcohol deprivation increases alcohol operant self-administration during reinstatement. *Neuropharmacology*, 2004; 47: 1036-1044.
- LOVINGER DM, WHITE G, WEIGHT FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 1989; 243(4899): 1721-1724.
- LUCAS ACS, PARENTE RCP, PICAÑO NS, CONCEIÇÃO DA, DA COSTA KRC, MAGALHÃES IRS, SIQUEIRA JCA. Use of psychoactive drugs by health sciences undergraduate students at the Federal University in Amazonas, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 2006; 22(3): 663-671.
- MACRI S, ADRIANI W, CHIAROTTI F, LAVIOLA G. Risk-taking during exploration of a plusmaze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Anim Behav*, 2002; 64: 541-546.
- MALLET KA, LEE CM, NEIGHBORS C, LARIMER ME, TURRISI R. Do we learn from our mistakes? An examination of the impact of negative alcohol-related consequences on college students' drinking patterns and perceptions. *Journal of Studies on Alcohol*, 2006; 26(2): 269-276.
- MAMELI M, ZAMUDIO PA, CARTA M, VALENZUELA CF. Developmentally regulated actions of alcohol on hippocampal glutamatergic transmission. *The Journal of Neuroscience*, 2005; 25(35): 8027-8036.
- MARIN P, MAUS M, DESAGHER S, GLOWINSKI J, PRKMONT J. Nicotine protects cultured striatal neurones against n-methyl-d-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. *Neuroreport*, 1994; 5: 1977-1980.
- MARINELLI S, PASCUCCI T, BERNARDI G, PUGLISI-ALLEGRA S, MERCURI NB. Activation of TRPV1 in the VTA excites dopaminergic neurons and increases chemical- and noxious-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 2005; 30: 864-870.
- MARTTILA K, RAATTAMAA H, AHTEE L. Effects of chronic nicotine administration and its withdrawal on striatal FosB/DeltaFosB and c-Fos expression in rats and mice. *Neuropharmacology*, 2006; 51: 44-51.
- MATTHEWS DA, NADLER JV, LYNCH GS, COTMAN CW. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. *Dev. Biol.*, 1974; 36: 130-141.

- MCGEHEE DS, ROLE LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annual Review Physiology*, 1995; 57:521-46.
- MCGEHEE DS. Nicotine and Synaptic Plasticity in Prefrontal Cortex. *Sci STKE*, 2007; 399: 1-2.
- MCDONALD CG, DAILEY VK, BERGSTROM HC, WHEELER TL, EPPOLITO AK, SMITH LN, SMITH RF. Periadolescent nicotine administration produces enduring changes in dendritic morphology of medium spiny neurons from nucleus accumbens. *Neuroscience Letters*, 2005; 385: 163-167.
- MCDONALD JW, JOHNSTON MV, YOUNG AB. Differential ontogenic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Experimental Neurology*, 1990; 110: 237-247.
- MCGAUGH JL. Memory-a century of consolidation. *Neuroscience*, 2000; 287: 248-51.
- MCWILLIAMS JR, LYNCH G. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science*, 1983; 221: 572-574.
- MIHIC SJ, HARRIS RA. GABA and the GABA_A receptor. *Alcohol Health & Research World*, 1997; 21(2): 127-131.
- MILEDI R. Intracellular calcium and desensitization of acetylcholine receptors, *Proc. R. Soc. Lond.*, 1980; 209 B: 447- 452.
- MILLER NS, GOLD MS. Comorbid cigarette and alcohol addiction: epidemiology and treatment. *J Addict Dis*, 1998; 17: 55-66.
- MINANA MD, MONTOLIU C, LLANSOLA M, GRISOLIA S, FELIPO V. Nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacology*, 1998; 37: 847-857.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=29796
- MISHKIN M *et al.*, 1984. Neurobiology of Human Learning and Review *TRENDS in Neurosciences*, 2003; 26(4): 65–87. Memory (McGaugh, J.L., Weinberger, N.M., et al. eds), Guildford.
- MOGHADDAM B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal gangli. *J Neurochem.*, 1993; 60(5): 1650-7.
- MOORE MS, DEZAZZO J, LUK AY, TULLY T, SINGH CM, HEBERLEIN U. Ethanol intoxication in drosophila: genetic and pharmacological evidence for regulation by the camp signaling pathway. *Cell Press*, 1998; 93: 997-1007.
- MOY SS, DUNCAN GE, KNAPP DJ, BREESE GR. Sensitivity to ethanol across development in rats: comparison to [3H] zolpidem binding. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 1998; 22: 1485-1492.
- MUNAKATA Y, CASEY BJ, DIAMOND A. Developmental cognitive neuroscience: progress and potential. *Trends Cogn Sci.*, 2004; 8: 122-128.
- MYHRER T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: A meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Brain Research Review*, 2003; 41: 268-287.
- NADLER JV, MATTHEWS DA, COTMAN CW, LYNCH GS. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. II. Quantitative changes

- in choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Dev. Biol.*, 1974; 36: 142-154.
- NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM – NIAAA. Biochemical effects of alcohol metabolism. In: eighth special report to the U.S. congress on alcohol and health. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 1993; 148-164.
- NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, NICOTINE ADDICTION, NIH Publication Number 98- 4342, Washington, DC, 1998, 7 pp.
- NELSON DE, GIOVINO GA, SHOPLAND DR, MOWERY PD, MILLS SL, ERIKSEN MP. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *Am J Public Health*, 1995; 85: 34-40.
- NESTLER EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001; 2: 119-128.
- NEWHOUSE P, SINGH A, POTTER A. Nicotine and nicotinic receptor involvement in neuropsychiatric disorders. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004; 4: 267-282.
- NISHIZAKI T, SUMIKAWA K. Effects of PKC and PKA phosphorylation on desensitization of nicotinic acetylcholine receptors, *Brain Res.*, 1998; 812: 242–245.
- NOJIMA H, SASAKI T, KIMURA I. Arachidonic acid and prostaglandin D2 cooperatively accelerate desensitization of nicotinic acetylcholine receptor channel in mouse skeletal muscles, *Brain Res.*, 2000; 852: 233-238.
- NORDBERG A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry*, 2001; 49: 200-210.
- NOWAK A, JONDERKO K, KACZOR R, NOWAK S, SKRZYPEK D. Cigarette smoking delays gastric emptying of a radiolabelled solid food in healthy smokers. *Scand J Gastroenterol*, 1987; 22: 54-58.
- NUNES E. Consumo de tabaco – Efeitos na saúde. *Rev Port Clin Geral*, 2006; 22: 225-244.
- NUUTINEN S, AHTEE L, TUOMINEN RK. Time and brain region specific up-regulation of low affinity neuronal nicotinic receptors during chronic nicotine administration in mice. *Eur J Pharmacol.*, 2005; 515: 83-9.
- ONETA CM, SIMANOWSKI UA, MARTINEZ M, ALLALI-HASSANI A, PARÉS X, HOMANN N, CONRADT C, WALDHERR R, FIEHN W, COUTELLE C, SEITZ HK. First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric emptying. *Gut*, 1998; 43: 612- 619.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Alcohol, 2005. Disponível no site: http://www.who.int/substance_abuse/facts/alcohol/en/index.html
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Informe sobre la salud en el mundo 2002. Reducir los riesgos y promover una vida sana. Genebra, 2002a.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). TABAGISMO & SAÚDE NOS PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO RELATÓRIO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002b. Documento organizado pela Comissão Europeia em colaboração com a Organização Mundial de Saúde e o Banco Mundial para a Mesa Redonda de Alto Nível sobre Controle do Tabagismo e Políticas de Desenvolvimento, Fev/2003. Tradução: Instituto Nacional do Câncer e Ministério da Saúde do Brasil.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). The Global Youth Tobacco Survey: Results In The Americas. *Epidemiological Bulletin*, 2002c; 23(2): 6-9.

- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). World Health Organization – Department of Mental Health and Substance Abuse. Global Status Report on Alcohol, 2004; 1:88.
- OROSZI G, GOLDMAN D. Alcoholism: genes and mechanisms. *Pharmacogenomics*, 2004; 5: 1037-1048.
- PACKARD MG, KNOWLTON BJ. Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2002; 25: 563-593.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. 1998. in: Alcohol per capita consumption, patterns of drinking and abstention worldwide after 1995. Appendix 2 of *European Addiction Research*, 2001, 7(3): 155-157.
- PARNELL SE, WEST JR, CHEN WJ. Nicotine decreases blood alcohol concentrations in adult rats: a phenomenon potentially related to gastric function. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2006; 30: 1408-13.
- PARSONS OA, NIXON SJ. Cognitive functioning in sober social drinkers: a review of the research since 1986. *J Stud Alcohol*, 1998; 59: 180-190.
- PASCUAL M, BLANCO AM, CAULI O, MINARRO J, GUERRI C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci.*, 2007; 25: 541–50.
- PATERSON D, NORDBERG A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol*, 2000; 61: 75-111.
- PENLAND S, HOPLIGHT B, OBERNIER J, CREWS FT. Effects of nicotine on ethanol dependence and brain damage. *Alcohol*, 2001; 24: 45-54.
- PETERSEN AC, SILBEREISEN RK, SÖRENSEN S. Adolescent development: a global perspective. In: Hurrelmann K, Hamilton SF, editors. *Social problems and social contexts in adolescence*, New York, NY: Aldine de Gruyter, 1996; 3-37.
- PHILLIPS RG, LEDOUX JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning, *Behav. Neurosci.*, 1992; 106: 274.
- PICCIOTTO MR, BRUNZELL DH, CALDARONE BJ. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, 2002; 13: 1097-1106.
- PIERCE JP, GILPIN E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *Am. J. Pub. Health*, 1996; 86: 253-256.
- PILLON SC, O'BRIEN B, PIEDRA, KAC. The relationship between drugs use and risk behaviours in brazilian university students. *Rev Latino-am Enfermagem* 2005 novembro-dezembro; 13(número especial): 1169-76.
- POPOVIC M, CABALLERO-BLEDA M, PUELLES L, GUERRI C. Multiple binge alcohol consumption during rat adolescence increases anxiety but does not impair retention in the passive avoidance task. *Neurosci. Lett.*, 2004; 357: 79-82.
- POWELL K. Neurodevelopment: how does the teenage brain work? *Nature*, 2006; 442: 865-7.
- PRENDERGAST MA, HARRIS BR, MAYER S, LITTLETON JM. Chronic, but not acute, nicotine exposure attenuates ethanol withdrawal-induced hippocampal damage in vitro. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2000; 24(10): 1583-1592.
- QUAGLIA G. Seminário Internacional do Cone Sul sobre Prevenção ao Uso de Drogas no Trabalho, Porto Alegre – RS, 2004.
- QUERTEMONT E, DIDONE V. Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Research and Health*, 2005; 29(4): 258-265.

- QUERTEMONT E. Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Mol. Psychiatry*, 2004; 9: 570–581.
- QUERTEMONT E, TAMBOUR S, BERNAERTS P, ZIMATKIN SM, TIRELLI E. Behavioral characterization of acetaldehyde in C57BL/6J mice: locomotor, hypnotic, anxiolytic and amnesic effects. *Psychopharmacology (Berl)*, 2004; 177: 84-92.
- RAIHA NC, KOSKINEN M, PIKKARAINEN P. Developmental changes in alcohol-dehydrogenase activity in rat and guinea-pig liver. *Biochemical Journal*, 1967; 103: 623-626.
- RAKIC P, BOURGEOIS JP, GOLDMAN-RAKIC PS. Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Prog. Brain Res.*, 1994; 102: 227-243.
- REZAYOF A, MOTEVASSELI T, RASSOULI Y, ZARRINDAST M-R. Dorsal hippocampal dopamine receptors are involved in mediating ethanol state-dependent memory. *Life Sci.*, 2007; 80(4): 285-292.
- REZVANI AH, LEVIN ED. Nicotine-alcohol interactions and attentional performance on an operant visual signal detection task in female rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003; 76: 75-83.
- REZVANI AH, LEVIN ED. Nicotine-alcohol interactions and cognitive function in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002; 72: 865-872.
- RHODES MC, SEIDLER FJ, QIAO D, TATE CA, COUSINS MM, THILLAI I, SLOTKIN TA. Does pharmacotherapy for preterm labor sensitize the developing brain to environmental neurotoxicants? Cellular and synaptic effects of sequential exposure to terbutaline and chlorpyrifos in neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003; 195: 203-217.
- RIEDEL G, MICHEAU J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 2001; 25(4):835-53.
- ROOM R, JERNIGAN D, CARLINI-MARLATT B, GUREJE O, MÄKELÄ K, MARSHALL M, MEDINA-MORA ME, MONTEIRO M, PARRY C, PARTANEN J, RILEY L, SAXENA S. Alcohol in Developing Societies: A Public Health Approach. Helsinki, Finnish Foundation for Alcohol Studies in collaboration with World Health Organization, 2002.
- ROSEMBERG J, MIRANDA MA, ROSEMBERG AMA. Nicotina - Droga Universal. São Paulo (BR): Instituto Nacional de câncer (INCA); 2004. Disponível online: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/nicotina.pdf>
- ROSENBERG DR, LEWIS DA. Changes in the dopaminergic innervation of monkey prefrontal cortex during late postnatal development: a tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *Biol Psychiatry.*, 1994; 36: 272-277.
- SAMOCHOWIEC J, LESCH KP, ROTTMANN M, SMOLKA M, SYAGAILO YV, OKLADNOVA O, ROMMELSPACHER H, WINTERER G, SCHMIDT LG, SANDER T. Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase a gene with antisocial alcoholism. *Psychiatry Res.*, 1999; 86:67-72.
- SAMSON HH, HARRIS RA. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1992; 13: 206-211.
- SANNA E, SERRA M, COSSU A, BOLOMBO G, FOLLESA P, CUCCHEDDU T, CONCAS A, BIGGIO G. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA_A and NMDA receptor function in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res.*, 1993; 17: 115-123.

- SANTUCCI AC, MERCADO M, BETTICA A, CORTES C, YORK D, MOODY E. Residual behavioral and neuroanatomical effects of short-term chronic ethanol consumption in rats. *Cognitive Brain Research*, 2005; 20: 449-461.
- SAPOLSKY RM, MEANEY MJ, MCEWEN BS. The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. III. Negativefeedback regulation. *Developmental Brain Research*, 1985; 18: 169-73.
- SARGENT PB. The distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. In: *Neuronal nicotinic receptors* (Clement F *et al.*, EDS), 2000; 163-192.
- SARGENT PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 1993; 16: 403-43.
- SASAKI H, MATSUZAKI T, NAKAGAWA HA, SEKIZAWA K, MARUYAMA Y. Cognitive function in rats with alcohol ingestion. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52(4):845-8.
- SCHEETZ AJ, CONSTANTINE-PATON M. Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J.*, 1994; 8: 745-752.
- SCHMID B, HOHM E, BLOMEYER D, ZIMMERMANN US, SCHMIDT MH, ESSER GU, LAUCHT M. Concurrent alcohol and tobacco use during early adolescence characterizes a group at risk. *Alcohol & Alcoholism*, 2007; 42(3): 219-225.
- SCIVOLETTO S, MALBERGIER A. Fundamentos de toxicologia – parte 4: Toxicologia social e medicamentos, 4.5. Etanol. *Seizi Oga*, 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003; 271-286.
- SCOTT AM, KELLOW JE, SHUTER B, NOLAN JM, HOSCHL R, JONES MP. Effects of cigarette smoking on solid and liquid intragastric distribution and gastric emptying. *Gastroenterology*, 1993; 104: 410-416.
- SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS (SENAD). Cartilha Álcool e Jovens, 2005. Disponível no site: <http://www.senad.gov.br/cartilhas/Alcool%20e%20Jovens.pdf>
- SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS (SENAD). Cartilha sobre Tabaco, 2005. Disponível no site: <http://www.senad.gov.br/cartilhas/Tabaco.pdf>
- SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS (SENAD). VI Semana Nacional Antidrogas, Brasília, 2004.
- SEEMAN JI, DIXON M, HAUSSMANN HJ. Acetaldehyde in Mainstream Tobacco Smoke: Formation and Occurrence in Smoke and Bioavailability in the Smoker. *Chem. Res. Toxicol.*, 2002; 15(11): 1331-1350.
- SEINDENBECHER T, LAXMI R, STORK O, PAPE HC. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science*, 2003; 301: 846-50.
- SHIMOHAMA S, AKAIKE A, IOMURA J. N-icotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. *Ann NY Acad Sci.*, 1996; 777: 356-361.
- SILVERI MM, SPEAR LP. Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol*, 2000; 20: 45-53.
- SIRCAR R, SIRCAR D. Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005; 29: 1402-1410.
- SIRCAR R, SIRCAR D. Repeated ethanol treatment in adolescent rats alters cortical NMDA receptor. *Alcohol*, 2006; 39: 51-58.
- SLOTKIN TA. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol. Teratol.*, 2002; 24: 369-384.

- SMITH LN, MCDONALD CG, BERGSTROM HC, BRIELMAIER JM, EPPOLITO AK, WHEELER TL, FALCO AM, SMITH RF. Long-term changes in fear conditioning and anxiety-like behavior following nicotine exposure in adult versus adolescent rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006; 85: 91-97.
- SNEDECOR GW, COCHRAN WG. *Statistical Methods*. 6. ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1967.
- SODERPALM B, ERICSON M, OLAUSSON P, BLOMQUIST O, ENGEL JA. Nicotinic mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol. *Behav. Brain Res.*, 2000; 113: 85-96.
- SOWELL ER, DELIS D, STILES J, JERNIGAN TL. Improved memory functioning and frontal lobe maturation between childhood and adolescence: a structural MRI study. *J Int Neuropsychol Soc.*, 2001; 7: 312-322.
- SOWELL ER, THOMPSON PM, HOLMES CJ, BATH R, JERNIGAN TL, TOGA AW. Localizing age-related changes in brain structure between childhood and adolescence using statistical parametric mapping. *Neuroimage*, 1999; 9: 587-597.
- SPARKS JA, PAULY JR. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57B1/6 mice. *Psychopharmacol.*, 1999; 141: 145-153.
- SPEAR LP, BRAKE SC. Periadolescence: Age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol*, 1983; 16: 83-109.
- SPEAR LP, SHALABY IA, BRICK J. Chronic administration of haloperidol during development: behavioral and psychopharmacological effects. *Psychopharmacology*, 1980; 70: 47-58.
- SPEAR LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2000; 24: 417-463.
- SPEAR LP. The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *J Stud Alcohol Suppl*, 2002; 14: 71-81.
- STEELE-RUSSELL I, RUSSELL MI, CASTIGLIONI JA, REUTER JA, VAN HOF MW. Selective attention and Pavlovian conditioning. *Exp Brain Res.*, 2006; 173: 587-602.
- SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION (SAMHSA). Preliminary Results from the 1997 National Household Survey on Drug Abuse. NHSDA Series H-6. DHHS Pub. No. (SMA) 98-3251. Rockville, MD: SAMHSA, 1998.
- SVENSSON CK. Clinical pharmacokinetics of nicotine. *Clin Pharmacokin*, 1987; 12, 30-40.
- SWANN JW, PIERSON MG, SMITH KL, LEE CL. Developmental neuroplasticity: roles in early life seizures and chronic epilepsy. *Adv Neurol.*, 1999; 79: 203-216.
- SWARTZWELDER HS, WILSON WA, TAYYEB MI. Differential sensitivity of NMDA receptor-mediated synaptic potentials to ethanol in immature versus mature hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res.*, 1995; 19: 320-323.
- TABAKOFF B, HOFFMAN PL, MOSES F. Neurochemical correlates of ethanol withdraw: alterations in serotonergic function. *J Pharm Pharmacol* 1977; 29: 471-476.
- TABAKOFF B, HOFFMAN PL. Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci.*, 1983; 32(3): 197-204.
- TABAKOFF B. Current trends in biologic research on alcoholism. *Drug Alcohol Depend*, 1983; 11(1): 33-7.

- TALHOUT R, OPPERHUIZEN A, VAN AMSTERDAM JGC. Role of acetaldehyde in tobacco smoke addiction. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 2007; 17(10): 627-36.
- TAMMIMAKI A, PIETILA K, RAATTAMAA H, AHTEE L. Effect of quinpirole on striatal dopamine release and locomotor activity in nicotine-treated mice. *Eur J Pharmacol.*, 2006; 531: 118-25.
- TANAPAT P, HASTINGS NB, REEVES AJ, GOULD E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 5792-5801.
- TANG YP, SHIMIZU E, DUBE GR, RAMPON C, KERCHNER GA, ZHUO M, LIU G, TSIEN JZ. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 1999; 401: 63-69.
- TAPERT SF, CALDWELL L, BURKE C. Alcohol and the Adolescent Brain – Human Studies. *Alcohol Research & Health*, 2004-2005; 28(4): 205-212.
- TASSONYI E, CHARPANTIER E, MULLER D, DUMONT L, BERTRAND D. The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Research Bulletin*, 2002; 57: 133-150.
- TAVARES BF, BÉRIA JU, LIMA MS. Factors associated with drug use among adolescent students in southern Brazil. *Rev Saúde Pública*, 2004; 38(6): 1-9.
- TEICHER MH, ANDERSEN SL, HOSTETTER JC. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Develop. Brain Res.*, 1995; 89: 167-172.
- TEICHER MH, ANDERSEN SL, POLCARI A, ANDERSON CM, NAVALTA CP, KIM DM. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* , 2003; 27: 33-44.
- THOMAS MP, MORRISETT RA. Dynamics of NMDAR-mediated neurotoxicity during chronic ethanol exposure and withdrawal. *Neuropharmacology*, 2000; 39(2): 218-226.
- TIZABI Y, AL-NAMAEH M, MANAYE KF, TAYLOR RE. Protective effects of nicotine on ethanol-induced toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Neurotox Res*, 2003; 5: 315-321.
- TIZABI Y, COPELAND RLJ, LOUIS VA, TAYLOR RE. Effects of combined systemic alcohol and central nicotine administration into ventral tegmental area on dopamine release in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002; 26: 394-399.
- TIZABI Y, MANAYE KF, SMOOT DT, TAYLOR RE. Nicotine inhibits ethanol-induced toxicity in cultured cerebral cortical cells. *Neurotox Res.*, 2004; 6: 311-316.
- TOKUNAGA S, SILVERS JM, MATTHEWS DB. Chronic intermittent ethanol exposure during adolescence blocks ethanol-induced inhibition of spontaneously active hippocampal pyramidal neurons. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2006; 30: 1-6.
- TRACY HA, WAYNER MJ, ARMSTRONG DL. Nicotine blocks ethanol and diazepam impairment of air righting and ethanol impairment of maze performance. *Alcohol*, 1999; 18: 123-130.
- TRAUTH JA, SEIDLER FJ, ALI SF, SLOTKIN TA. Adolescent nicotine exposure produces immediate and long-term changes in CNS noradrenergic and dopaminergic function. *Brain Res.*, 2001; 892: 269-280.
- TRAUTH JA, SEIDLER FJ, SLOTKIN TA. Persistent and delayed behavioral changes after nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res.*, 2000; 880: 167-172.

- TSAI GE, RAGAN P, CHANG R, CHEM S, LINNOILA VM, COYLE JT. Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal. *Am J Psychiatry*, 1998; 155: 726-732.
- TSUKADA H, MIYASATO K, NISHIYAMA S, FUKUMOTO D, KAKIUCHI T, DOMINO EF. Nicotine normalizes increased prefrontal cortical dopamine D1 receptor binding and decreased working memory performance produced by repeated pretreatment with MK-801: a pet study in conscious monkeys. *Neuropsychopharmacology*, 2005; 30, 2144-2153.
- TUTKA P, MOSIEWICZ J, WIELOSZ M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. *Pharmacological Reports*, 2005; 57: 143-153.
- UNGER JB, CHEN X. The role of social networks and media receptivity in predicting age of smoking initiation: A proportional hazards model of risk and protective factors. *Addictive Behaviors*, 1999; 24(3): 371-381.
- VAN EDEN CG, KROS JM, UYLINGS HB. The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. *Prog Brain Res.*, 1990; 85: 169-183.
- VARLINSKAYA EI, SPEAR LP. Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adult rats: role of familiarity of the test situation. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002; 26(10): 1502-511.
- VARLINSKAYA EI, SPEAR LP, SPEAR NE. Acute effects of ethanol on behavior of adolescent rats: Role of social context. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001; 25: 377-385.
- VIHAVAINEN T, MIJATOVIC J, PIEPPONEN TP, TUOMINEN RK, AHTEE L. Effect of morphine on locomotor activity and striatal monoamine metabolism in nicotine-withdrawn mice. *Behav Brain Res.*, 2006; 173: 85-93.
- VOLKOW ND, LI TK. Drugs and alcohol: treating and preventive abuse, addiction and their medical consequences. *Pharmacology and Therapeutics*, 2005; 108: 3-17.
- WALLACE JR JM, BACHMAN JG, O' MARLLEY PM, SCHULENBERG JE, COOPER SM, JOHNSTON LD. Gender and ethnic differences in smoking, drinking and illicit drug use among American 8th, 10th and 12th grade students, 1976-2000. *Addiction*, 2003; 98: 225-34.
- WANG H, SUN X. Desensitized nicotinic receptors in brain. *Brain Research Reviews*, 2005; 48: 420- 437.
- WHITE AM, GHIA AJ, LEVIN ED, SWARTZWELDER HS. Binge pattern ethanol exposure in adolescent and adult rats: differential impact on subsequent responsiveness to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2000; 24: 1251-6.
- WHITE AM, SWARTZWELDER HS. Age-related effects of alcohol on memory and memory-related brain function in adolescents and adults. *Recent Dev Alcohol*, 2005; 17: 161-176.
- WHITE AM, SWARTZWELDER HS. Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1021: 206-220.
- WHITE AM, TRUESDALE MC, BAE JG, AHMAD S, WILSON WA, BEST PJ, SWARTZWELDER HS. Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2002; 73: 673-677.
- WHITE AM. What Happened? Alcohol, Memory Blackouts, and the Brain. *Alcohol Research & Health*, 2003; 27(2): 186-196.

- WHITE HR. Longitudinal perspective on alcohol use and aggression during adolescence. In: Galanter, M., ed. Alcohol and Violence: Epidemiology, Neurobiology, Psychology, Family Issues, Recent Developments in Alcoholism, 1997; 13: 81-103.
- WILLS TA, VACCARO D, MCNAMARA G. Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *Journal of Substance Abuse*, 1994; 6: 1-20.
- WISE RA. Dopamine, Learning, and Motivation. *Nat Rev Neurosci.*, 2004; 5: 483-494.
- WONNACOTT S, KAISER S, MOGG A, SOLIAKOV L, JONES IW. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.*, 2000; 393: 51-58.
- WONNACOTT S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.*, 1997; 20: 92-98.
- WOOD T, WEWERS ME, GRONER J, AHJEVYCH K. Smoke constituent exposure and smoking topography of adolescent daily cigarette smokers. *Nicotine Tob Res*, 2004; 6: 853-862.
- XAVIER GF. Técnicas para o estudo do Sistema Nervoso. Plêiade: São Paulo, 1999.
- YIN R, FRENCH ED. A comparison of the effects of nicotine on dopamine and non-dopamine neurons in the rat ventral tegmental area: an in vitro electrophysiological study. *Brain Res. Bull.*, 2000; 51: 507-514.
- YOGESWARI P, RAGAVENDRAN JV, SRIRAM D. An update on GABA analogs for CNS drug discovery. *Recent Patents CNS Drug Discov.*, 2006; 1(1): 113-8.
- YU D, ZHANG L, EISELE JL, CHANGEUX JP, WEIGHT FF. Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine type $\alpha 7$ receptors involves the amino-terminal domain of the receptor. *Molecular Pharmacology*, 1996; 50: 1010-1016.
- ZAHALKA E, SEIDLER FJ, LAPPI SE, YANAI J, SLOTKIN TA. Differential development of cholinergic nerve terminal markers in rat brain regions: Implications for nerve terminal density, impulse activity and specific gene expression. *Brain Res.*, 1993; 601: 221-229.
- ZALESKI M, MORATO GS, DA SILVA VA, LEMOS T. Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da Síndrome de Abstinência do Álcool. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 2004; 26(1): 40-42.
- ZECEVIC N, BOURGEOIS JP, RAKIC P. Changes in synaptic density in motor cortex of rhesus monkey during fetal and postnatal life. *Brain Res Dev Brain Res.*, 1989; 50: 11-32.
- ZEIGLER DW, WANG CC, YOAST RA, DICKINSON BD, MCCAFFREE MA, ROBINOWITZ CB, STERLING ML. The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students. *Prev Med*, 2005; 40: 23-32.
- ZHOU FM, LIANG Y, DANI JA. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat. Neurosci.*, 2001; 4: 1224-1229.

5.1. Sítios consultados

<http://www.adroga.casadia.org/drogas/tabaco.htm>

<http://www.alcoolismo.com.br/alcoolismo.htm>

<http://www.alcoolismo.com.br/efeitos.html>

<http://www.anvisa.gov.br/tabaco/legis.htm>

http://www.estradas.com.br/sosestradas/estudos/estudo_acidentes.pdf

<http://www.inca.gov.br/tabagismo/>

<http://www.niaaa.nih.gov/Publications/>

<http://www.obid.senad.gov.br/OBID/Portal/index.jsp?iIdPessoaJuridica=1>

http://www.philipmorrisoninternational.com/BR/pages/por_BR/smoking/S_and_H.asp

<http://www.propagandasembebida.org.br/consenso/integra.php?id=24>

<http://www.psychology.uiowa.edu/Faculty/wasserman/Glossary/reinforcement.html>

<http://www.uerj.br/modulos/kernel/index.php?pagina=11>

<http://www.ufrj.br/institutos/it/de/acidentes/etanol5.htm>

<http://www.who.int/tobacco/en/>

8. ANEXO

Artigo:

Yael de Abreu-Villaça, Ana Heloisa de Medeiros,
Carla S. Lima, Felipe P. Faria, Cláudio C. Filgueiras,
Alex C. Manhães.

Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal.

Behavioural Brain Research 181 (2007) 136–146.

Available online at www.sciencedirect.com

Behavioural Brain Research 181 (2007) 136–146

**BEHAVIOURAL
BRAIN
RESEARCH**
www.elsevier.com/locate/abbr

Research report

Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal

Yael Abreu-Villaça*, Ana H. Medeiros, Carla S. Lima, Felipe P. Faria,
Cláudio C. Figueiras, Alex C. Manhães

Laboratório de Neurofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Av. Prof. Manuel de Abreu 444, 5 andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ 20550-170, Brazil

Received 26 March 2007; accepted 30 March 2007

Available online 5 April 2007

Abstract

Human adolescents often associate tobacco smoking and consumption of alcoholic beverages. In spite of this frequent association, little is known about the basic neurobiology of the dual exposure in the adolescent brain. In the present work, we assessed, through the use of the step-through passive avoidance box (2 mA, 2 s; test–retest interval of 24 h), short- and long-term memory/learning effects of nicotine (NIC) and/or ethanol (ETOH) exposure during adolescence (postnatal days 30–45; PN30–45) in four groups of male and female C57BL/6 mice: (1) concomitant NIC [nicotine free base solution (50 µg/ml) in 2% saccharin to drink] and ETOH [ethanol solution (25%, 2 g/kg) i.p. injected every other day] exposure; (2) NIC exposure; (3) ETOH exposure; (4) vehicle. During exposure (PN44–45), deficits in memory/learning due to concomitant NIC + ETOH exposure reflected the summation of the two individual sets of effects. During a short-term drug withdrawal (PN49–50), nicotine improved memory/learning, however, ethanol blocked nicotine-induced improvements. One month post-exposure (PN74–75), a significant female-only improvement in memory/learning was observed as a result of co-administration. In conclusion, our results suggest that detrimental effects of nicotine and ethanol on memory/learning during adolescent combined exposure represent a worsened outcome from the dual exposure. However, negative effects of the combined exposure fail to persist during withdrawal. In fact, the combined exposure elicits a sex-dependent late onset beneficial effect on memory/learning during withdrawal.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cognition; Development; Tobacco; Alcohol

1. Introduction

Adolescence, described as the transition from childhood to adulthood, is characterized by neuroendocrine alterations [90] as well as by maturational changes in the nervous system [15,59,75,93]. Particularly, animal models indicate that the maturation of central cholinergic systems involved in learning, memory and psychostimulant responses is consolidated during periadolescence [58,61,108], and an important aspect of this period is that neuronal stimulation induces marked synaptic rearrangement [80]. Both findings indicate that the adolescent brain is vulnerable to central nervous system stimulants. Unfor-

tunately, common features of this developmental period, such as adolescents' decreased anxiety and harm avoidance, and increased novelty-seeking behaviors [8,56,89], have been shown to reinforce experimentation and use of drugs of abuse in both humans and animal models [2,13,89,90,106].

Alcohol and nicotine are the most widely abused drugs. Epidemiological data have shown a great number of high school students smoking cigarettes – approximately one-third in the US [22] – and, in 2000, more than 50% of high school students reported drinking alcohol [49]. Additionally, tobacco smoking and alcohol consumption begin during adolescence [49,73] and an early onset of both smoking and alcohol drinking is a strong predictor of long-standing chemical dependency [23,42,62]. Furthermore, co-occurrence of tobacco smoking and alcohol consumption is frequent and well documented. In fact, 85% of alcoholics smoke and 30% of smokers are alcoholics

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2587 6295; fax: +55 21 2587 6129.
E-mail address: yaela_v@yahoo.com.br (Y. Abreu-Villaça).

[60]. Smokers consume more alcohol and are 10 times more likely to be alcoholics than non-smokers [20,28,30,53]. Perhaps most importantly, there is a strong association between onset of tobacco consumption at an early age and alcohol addiction [30,41], reinforcing the fact that adolescence is a period of vulnerability and suggesting that these drugs of abuse share neurochemical pathways that are particularly sensitive during this developmental period.

There is much yet to be known about the basic neurobiology of nicotine and ethanol exposure in the adolescent brain, however, there is evidence that memory and learning are behavioral endpoints affected by both drugs. Regarding nicotine, the pattern of its cognitive effects is still inconsistent. For instance, in adolescent rodents, memory and learning improvements were shown to be minimal during nicotine administration but were intensified in the post-treatment period [100]. Conversely, it has been shown that adolescents that smoke tobacco daily experience acute impairments of verbal and working memory during *ad libitum* smoking and during smoking withdrawal [48]. Similarly, effects of ethanol on cognition in adolescents are also controversial and seem to be highly dependent on the task used to assess cognitive performance. For instance, ethanol consumption in adolescent rats impairs memory during exposure and withdrawal in the Morris water-maze test [83,105] while it does not seem to affect memory during withdrawal in the passive avoidance test [74]. In any case, it has been shown that individuals who first use ethanol during adolescence are at an increased risk of presenting neurocognitive deficits [109].

At adulthood, nicotine and ethanol may interact so that one drug can potentiate or counteract effects of the other one. In this regard, most reports on cognitive effects of nicotine and ethanol co-administration in adult rodents indicate that one drug attenuates or opposes the effects of the other [40,76,77,98]. However, a very limited number of studies have investigated the potential behavioral interactions of nicotine and ethanol during adolescence. Accordingly, the purpose of the current study was to examine the effects of adolescent nicotine and/or ethanol administration on memory/learning during drug administration and withdrawal. Regular smokers tend to smoke intermittently in order to maintain blood levels of nicotine above a minimum effective concentration during their active period, therefore, we chose to give animals free access to a nicotine solution in the drinking water, which allows for consumption during their active time. For ethanol, we chose a moderate dose to be injected (i.p.) every other day, mimicking adolescents binge drinking. The step-through passive avoidance test was used to assess memory/learning during drug exposure and during short- and long-term withdrawal.

2. Methods

2.1. Animal treatment and behavioral testing

All experiments were carried out in accordance with the declaration of Helsinki and with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the National Institutes of Health. C57BL/6 mice were chosen because prior reports demonstrate that adult and periadolescent mice from this strain consume nicotine in the concentration used in the present

study [50,51,88]. All mice were bred and maintained in our laboratory. The animals were kept in a temperature-controlled room on a 12 h light:12 h dark cycle (lights on at 2:00 a.m.). Access to food and water was *ad libitum*. On the 1st postnatal day (PN1), litters were culled to a maximum of eight mice to ensure standard nutrition. At weaning (PN25) animals were separated by sex and allowed free access to food and water.

On PN29, pups from 601 (123 females and 128 males) were separated from their littermates and individually housed thereafter. Single housing may influence animals' behavior [32,101], however, it allowed for accurate measurement of fluid intake/nicotine consumption for each animal. Animals were exposed to nicotine and/or ethanol from PN30 to PN45 following a protocol that we have established in a previous study [1]. PN30–45 is the approximate age range during which animals of both genders and most breeding stock exhibit adolescent-typical behavioral characteristics and particular neurochemical and endocrine patterns when compared to adulthood and pre-pubertal periods [89]. During this period, (–)-nicotine free base (50 µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO) in 2% saccharin or 2% saccharin only were administered in the drinking water (the sole source of fluid) in order to mimic intermittent nicotine consumption; while 25% ethanol (2 g/kg) solution (v/v) in saline or saline only were injected (i.p.) every other day in order to mimic cyclical patterns of alcohol consumption [69,97,103]. This experimental design implicated that during the period of adolescent exposure, every 48 h, mice presented a period of ethanol intoxication followed by withdrawal [67].

Male and female mice from each litter were distributed into four treatment groups [1]: VEH (oral saccharin + injected saline), NIC (oral nicotine/saccharin + injected saline), ETOH (oral saccharin + injected ethanol) and those receiving the combined treatment: NIC + ETOH (oral nicotine/saccharin + injected ethanol). Bottles were cleaned and refilled daily. Loss due to leakage was measured from a bottle placed in an empty cage ("blank"), and subtracted from fluid consumption data. Body weights and fluid consumption were also measured every day. Since body weight increases significantly during adolescence, daily fluid intake data were obtained by dividing the absolute values of fluid intake of each animal by its own body weight.

Learning and memory were assessed in the step-through passive avoidance. Briefly, the test apparatus contained two chambers, each 20 cm × 16 cm × 15.6 cm (length × width × height). Subjects were placed in the lighted chamber and allowed up to 5 min to enter the darkened chamber, whereupon the door closed and they received a mild foot shock (2 mA/2 s). Twenty-four hours later, the animals were retested in the apparatus and allowed up to 5 min to cross into the dark chamber. Animals were selected in a random order and were tested alternating groups and sexes. All testing sessions were performed between 11:00 a.m. and 1:00 p.m. in a sound attenuated room. The time animals took to cross into the dark compartment on the first session (PA1) and on the second session (PA2) were noted. The learning/memory component of the passive avoidance task is expressed as an increase in the time spent in the lighted chamber from the 1st to the 2nd day of testing. Therefore, in order to visualize more clearly differences between groups, the learning/memory component of the task was also evaluated by calculating a memory/learning index as follows: (PA2 – PA1)/PA1.

It has been reported that the number of defecation boli (B) in the passive avoidance testing apparatus is a measure of anxiety level [74]. Therefore, in addition to the memory/learning measurements, for each animal, an index calculated by dividing B in the lighted chamber after the first test by the amount of time spent in that chamber (B/min) was used as an anxiety measure.

Mice were tested at one of the following time points: at the end of the drug administration period (PN44–45), during a short-term withdrawal (PN49–50) or during a long-term withdrawal (PN74–75). For mice tested during drug exposure, in order to avoid acute drug effects, such as motor impairment, the last ethanol injection was administered on PN44, just after the first test.

2.2. Data analysis of the effects on fluid intake/body weight, nicotine consumption and body weight

Data are compiled as means and standard errors. Initially, repeated-measures analyses of variance (rANOVA, data log-transformed whenever variance was heterogeneous) on each variable (fluid intake/body weight, nicotine consumption and body weight) were carried out. The following factors: TREATMENT (VEH, NIC, ETOH and NIC + ETOH) and SEX were used as within-subjects factors. DAY was considered the within-subjects factor. Whenever significant TREAT-

MENT \times DAY interactions were detected, pairwise *post hoc* analyses were carried out by using Fisher's Protected Least Significant Difference (FPLSD). Whenever significant TREATMENT \times SEX interactions were detected, appropriate lower order ANOVAs were utilized, followed by pairwise *post hoc* analyses (FPLSD).

2.3. Data analysis of PA1, PA2 and (PA2 – PA1)/PA1 index

Data are compiled as means and standard errors. To reduce the likelihood of type 1 statistical errors that might result from repeated testing of the global PA1 and PA2 data set, results were evaluated first by a global repeated-measures analyses of variance (rANOVA, data log-transformed whenever variance was heterogeneous) on all factors: TREATMENT (VEH, NIC, ETOH and NIC + ETOH), AGE (PN44–45, PN49–50, PN74–75) and SEX. If a TREATMENT \times AGE interaction was observed, rANOVAs were performed separately on the results of each age group using TREATMENT and SEX as between-subjects factors. SESSION (for PA1 and PA2 data) was considered the within-subjects factors. At each age, appropriate lower order ANOVAs were utilized whenever significant TREATMENT \times SEX interactions were detected. Figures presenting behavioral data were only segmented by sex when significant interactions with the TREATMENT factor were observed.

A global univariate analyses of variance (uANOVA), using the (PA2 \times PA1)/PA1 memory/learning index as the variable and TREATMENT, AGE and SEX as between-subjects factors was also performed. If a TREATMENT \times AGE interaction was observed, ANOVAs were performed separately on the results of each age group using TREATMENT and SEX as between-subjects factors. At each age, appropriate lower order ANOVAs were utilized whenever significant TREATMENT \times SEX interactions were detected. Figures presenting behavioral data were only segmented by sex when significant interactions with the TREATMENT factor were observed. In order to simplify the presentation of results, pairwise (between treatment groups) *post hoc* analyses (FPLSD) were only performed for the memory/learning index.

2.4. Data analysis of nicotine ethanol interactions

The one-dimensional statistical design described above, in which TREATMENT (VEH, NIC, ETOH and NIC+ETOH) was considered the between-subjects factor, was used to verify whether significant differences between the four treatment groups existed. However, the combined use of nicotine and ethanol can have more-than additive (synergistic), less-than-additive or additive effects which are not addressed by the one-dimensional design. Therefore, a two-dimensional design [1,3,6,78] was used. In this design, NICOTINE (treated: NIC and NIC+ETOH; non-treated: VEH and ETOH) was considered one of the between-subjects factors. ETHANOL (treated: ETOH and NIC+ETOH; non-treated: VEH and NIC) was considered the other between-subjects factor. In this formulation, more-than additive (synergistic) and less-than-additive effects appear as significant interactions between the two treatment dimensions, whereas simple, additive effects do not show significant interactions.

Effects were considered significant when $P < 0.05$ (two-tailed). For interactions at $P < 0.10$ (two-tailed), we also examined whether lower order main effects were detectable after subdivision of the interactive factors [86].

2.5. Data analysis of anxiety

Regarding the anxiety measure, Kendall's coefficient of rank correlation (τ) was calculated in order to ascertain whether B/min was associated with PA1 and with the (PA2 – PA1)/PA1 index. Differences between groups regarding the distribution of B/min were initially evaluated by means of a Kruskal–Wallis test (K–W). Pairwise *post hoc* comparisons were carried out by Mann–Whitney *U*-tests (M–W).

3. Results

3.1. Effects on fluid intake/body weight, nicotine consumption and body weight

As indicated by the rANOVA, fluid intake/body weight increased throughout the experiment (DAY: $F = 80.8$, d.f. = 7.9, $P < 0.0001$; days 1–5: 0.27 ± 0.004 ml/g; days 6–10: 0.32 ± 0.003 ml/g; days 11–15: 0.34 ± 0.003 ml/g). We detected a main TREATMENT effect ($F = 6.2$, d.f. = 3, $P < 0.0001$): nicotine exposure elicited a significant reduction in fluid intake/body weight relative to the VEH ($P < 0.0002$, FPLSD) and ETOH ($P < 0.006$, FPLSD) groups (Table 1), suggestive of an aversive taste effect. Ethanol injections alone had no effect on fluid intake/body weight (since ETOH = VEH, $P = 0.27$, FPLSD). Animals receiving the combined treatment showed reduction in fluid intake/body weight (NIC + ETOH < VEH, $P < 0.003$, FPLSD) similar to that obtained with nicotine treatment alone (since NIC = NIC + ETOH, $P = 0.39$, FPLSD) (Table 1). The two-dimensional analysis of the treatment variables indicated no significant interaction of NICOTINE \times ETHANOL, connoting the fact that ethanol injections did not alter the response to nicotine administration. There were no interactions between treatments and sex.

Nicotine consumption significantly increased (DAY: $F = 47.9$, d.f. = 7.9, $P < 0.0001$) throughout the experiment (days 1–5: 12.4 ± 0.2 mg/kg; days 6–10: 15.2 ± 0.2 mg/kg; days 11–15: 16.5 ± 0.2 mg/kg). We also found an interaction of TREATMENT \times DAY ($F = 56.4$, d.f. = 7.9, $P < 0.04$), however, this reflected inconsistent results since significant differences

Table 1
Mean fluid intake/body weights, nicotine consumption and body weights

Measure	VEH	NIC	ETOH	NIC+ETOH
Fluid intake/body weight ^a	$0.33 \pm 0.004^{d,e}$	0.29 ± 0.004	0.32 ± 0.004^d	0.30 ± 0.003
Nicotine consumption ^b	–	14.4 ± 0.181	–	15.0 ± 0.173
Body weight ^c				
Male	15.32 ± 0.123	14.36 ± 0.151	14.0 ± 0.139	13.87 ± 0.150
Female	12.84 ± 0.102	12.12 ± 0.107	12.66 ± 0.106	12.88 ± 0.103

Daily measurements from PN30 to PN45 were used to calculate mean values.

^a Milliliters/gram.

^b Milligrams/kilogram.

^c Grams.

^d Values for which there were significant differences from the NIC group.

^e Values for which there were significant differences from the NIC+ETOH group. $P < 0.05$. Mean \pm S.E.M. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC + ETOH, nicotine and ethanol exposure group.

Table 2
Overall analysis of memory/learning effects

Effect	One-dimensional design	Effect	Two-dimensional design
rANOVA (PA1, PA2)			
SESSION × TREATMENT	$F = 2.5, d.f. = 3, P = 0.060$	SESSION × ETHANOL TREATMENT × AGE	$F = 7.2, d.f. = 2, P = 0.001$
SESSION × TREATMENT × AGE	$F = 4.3, d.f. = 6, P < 0.0001$	SESSION × NIC TREATMENT × AGE	$F = 4.4, d.f. = 2, P = 0.014$
SESSION × TREATMENT × AGE × SEX	$F = 2.1, d.f. = 6, P = 0.058$	SESSION × NIC TREATMENT × AGE × SEX	$F = 3.5, d.f. = 2, P = 0.034$
uANOVA ((PA2 – PA1)/PA2)			
TREATMENT	$F = 2.7, d.f. = 3, P = 0.048$	ETHANOL TREATMENT × AGE	$F = 7.4, d.f. = 2, P = 0.001$
TREATMENT × AGE	$F = 4.5, d.f. = 6, P < 0.0001$	NIC TREATMENT × AGE	$F = 4.7, d.f. = 2, P = 0.010$
TREATMENT × AGE × SEX	$F = 2.1, d.f. = 6, P = 0.060$	NIC TREATMENT × AGE × SEX	$F = 3.3, d.f. = 2, P = 0.044$

The main effects and interaction terms which showed no significant differences are not shown in the table.

between groups were restricted to 2 days, compounded by the fact that no systematic bias was observed: a reduction in consumption for the NIC when compared to the NIC + ETOH group confined to the 8th day ($F = 4.5, d.f. = 1, P < 0.04$) and, inversely, an increase in consumption for the NIC when compared to the NIC + ETOH group confined to the 13th day ($F = 4.1, d.f. = 1, P < 0.05$) of exposure. There were no main TREATMENT or TREATMENT × SEX interactions (Table 1).

In spite of treatment differences in fluid intake/body weight and in nicotine consumption, body weight gain was not affected by the treatment. No TREATMENT effect or interactions were observed (Table 1).

3.2. Overall statistical analysis of memory/learning measures

Both the global rANOVA (PA1 and PA2) and the global uANOVA ((PA2 – PA1)/PA1) indicated that significant effects and interactions were present in the one- and two-dimensional analyses, as indicated in Table 2. Therefore, lower order analyses were required: given the interactions of each treatment with AGE, we separated the data according to age group and then re-examined the results. Treatments were also interactive with SEX, so after subdividing the data, we kept this variable in the analysis to see if treatment interactions remained detectable.

3.3. Memory/learning effects

During exposure (PN44–45; Fig. 1A), the one-dimensional rANOVA indicated that the time animals spent in the lighted chamber increased significantly from the 1st to the 2nd day (SESSION effect: $F = 125.9, d.f. = 1, P < 0.001$) and that this increase in time was affected by TREATMENT (SESSION × TREATMENT interaction: $F = 4.1, d.f. = 3, P < 0.01$), a fact that was corroborated by the analysis of the ((PA2 – PA1)/PA1) index (uANOVA; TREATMENT effect: $F = 4.6, d.f. = 3, P = 0.006$). *Post hoc* analyses indicated that the VEH group was significantly more efficient in the learning/memory task than the ETOH (FPLSD; $P < 0.04$) and NIC + ETOH (FPLSD; $P < 0.001$) groups (Fig. 1B). Differences approaching significance were observed between VEH and NIC (FPLSD; $P = 0.096$; VEH > NIC) and between NIC and NIC + ETOH (FPLSD; $P = 0.055$; NIC > NIC + ETOH). The two-dimensional analysis failed to find significant NICO-

TINE × ETHANOL interactions, which indicated that the effects of the combined treatment could not be considered less-than-additive, connoting simple summation of nicotine and ethanol effects.

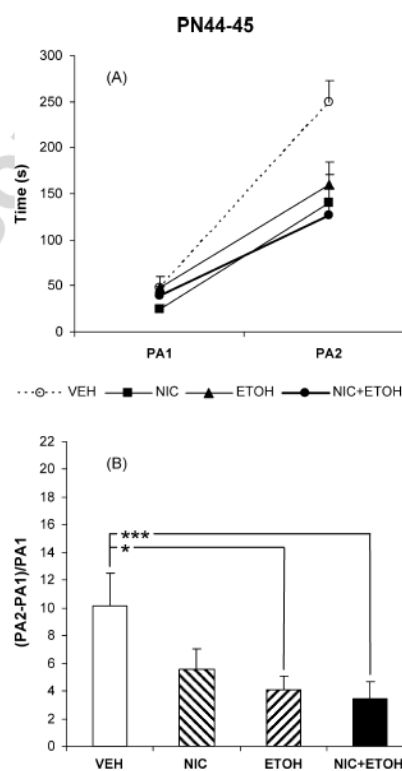


Fig. 1. Effects of adolescent nicotine and/or ethanol treatment on memory/learning assessed in the step-through passive avoidance during exposure (PN44–45). (A) Time that animals took to cross into the dark compartment on the first (PA1) and second (PA2) days of testing. (B) Memory/learning index ((PA2 – PA1)/PA1). Values are means ± S.E.M. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC + ETOH, nicotine and ethanol exposure group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significant difference between groups as revealed by FPLSD.

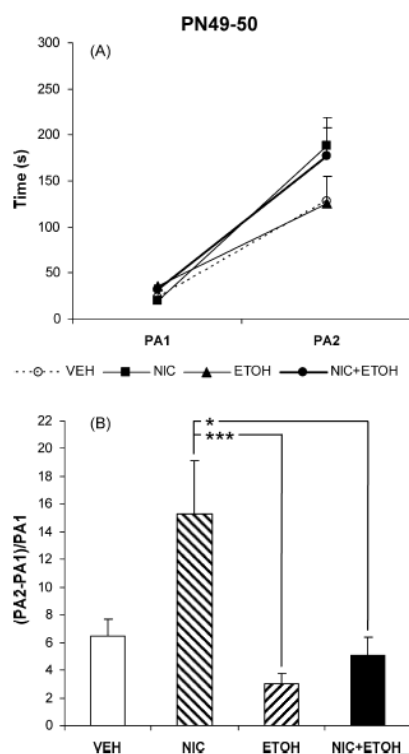


Fig. 2. Effects of adolescent nicotine and/or ethanol treatment on memory/learning assessed in the step-through passive avoidance during a short-term withdrawal (PN49–50). (A) Time that animals took to cross into the dark compartment on the 1st (PA1) and 2nd (PA2) days of testing. (B) Memory/learning index ((PA2 – PA1)/PA1). Values are means \pm S.E.M. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC+ETOH, nicotine and ethanol exposure group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significant difference between groups as revealed by FPLSD.

During a short-term withdrawal (PN49–50; Fig. 2A), the one-dimensional rANOVA also indicated that the time animals spent in the lighted chamber increased significantly from the 1st to the 2nd day (SESSION effect: $F = 174.8$, $d.f. = 1$, $P < 0.001$) and that this increase in time was affected by TREATMENT (SESSION \times TREATMENT interaction: $F = 4.9$, $d.f. = 3$, $P = 0.004$), a fact that was corroborated by the analysis of the (PA2 – PA1)/PA1 index (uANOVA; TREATMENT effect: $F = 4.9$, $d.f. = 3$, $P = 0.004$). However, unlike the results regarding PN44–45, *post hoc* analyses indicated that the NIC group was the more efficient one in the learning/memory task, particularly when compared to ETOH (FPLSD; $P = 0.001$) and NIC+ETOH (FPLSD; $P = 0.013$) groups (Fig. 2B). A difference approaching significance was observed between VEH and ETOH (FPLSD; $P = 0.056$; VEH > ETOH). As previously observed for PN44–45, the two-dimensional analysis

failed to find significant NICOTINE \times ETHANOL interactions, indicating a simple summation of nicotine and ethanol effects.

During the long-term withdrawal (PN74–75; Fig. 3A and B), the one-dimensional rANOVA again indicated that the time animals spent in the lighted chamber increased significantly from the 1st to the 2nd day (SESSION effect: $F = 139.6$, $d.f. = 1$, $P < 0.001$). This increase in time was affected by TREATMENT in a SEX dependent manner (SESSION \times TREATMENT \times SEX interaction: $F = 4.2$, $d.f. = 3$, $P < 0.01$). These findings were confirmed by the analysis of the (PA2 – PA1)/PA1 index (uANOVA; TREATMENT \times SEX interaction: $F = 4.2$, $d.f. = 3$, $P < 0.01$). In fact, a significant effect of TREATMENT (uANOVA; TREATMENT effect: $F = 4.2$, $d.f. = 3$, $P < 0.01$) was observed only for females. *Post hoc* analyses indicated that NIC + ETOH females were the more efficient ones in the learning/memory task when compared to the VEH (FPLSD; $P = 0.007$), NIC (FPLSD; $P = 0.016$) and ETOH (FPLSD; $P = 0.003$) groups (Fig. 3C). The two-dimensional analysis found a significant NICOTINE \times ETHANOL interaction, revealing a synergistic effect of nicotine and ethanol in females.

3.4. Anxiety effects

The first contact with the passive avoidance apparatus elicited a defecation reaction in mice (VEH: 1.8 ± 0.60 B/min; NIC: 2.1 ± 0.57 B/min; ETOH: 2.6 ± 0.72 B/min; NIC + ETOH: 2.5 ± 0.44 NB/min), which is considered an anxiety-related behavior. B/min was not associated with either PA1 ($\tau = 0.005$, $P > 0.10$) or (PA2 – PA1)/PA1 ($\tau = 0.08$, $P > 0.10$). Significant differences between treatment groups were found regarding B/min (K–W: $\chi^2 = 7.9$, $d.f. = 3$, $P = 0.049$). *Post hoc* comparisons indicated that only the combined NIC + ETOH exposure elicited a significant increase in B/min relative to the VEH exposure (M–W: $Z = 2.6$, $P = 0.01$), suggestive of an anxiogenic effect of the combined exposure. B/min did not vary as a function of the animals' age or sex.

4. Discussion

Smoking and consumption of alcoholic beverages are frequently associated during adolescence [20,28,30,41,53,60]. In spite of the epidemiological data, little is known about the possible interactions between these drugs, particularly at the critical developmental period of adolescence. The present study provides experimental evidence for functional interactions between nicotine and ethanol in the regulation of behavioral responses, focusing on memory/learning in adolescent mice.

4.1. Methodological issues

Considering that rats and some strains of mice have a taste aversion to nicotine, C57BL/6 mice were selected due to the fact that adult and periadolescent mice from this strain consume nicotine in the concentration used here [50,51,88]. In fact, oral nicotine has also been shown to be effective in eliciting

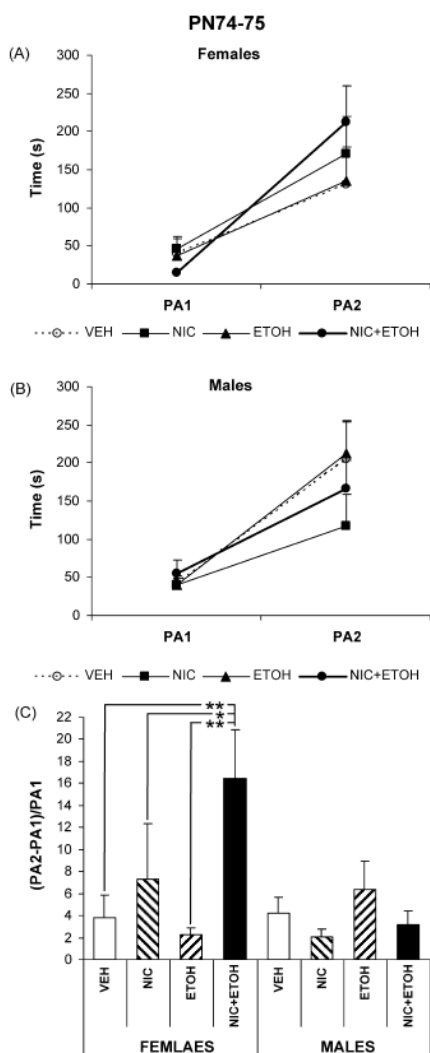


Fig. 3. Effects of adolescent nicotine and/or ethanol treatment on memory/learning assessed in the step-through passive avoidance 1 month post-exposure (PN75). (A) Time that female animals took to cross into the dark compartment on the 1st (PA1) and 2nd (PA2) days of testing. (B) Time that male animals took to cross into the dark compartment on the 1st (PA1) and 2nd (PA2) days of testing. (C) Memory/learning index ((PA2 - PA1)/PA1). Values are means \pm S.E.M. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC + ETOH, nicotine and ethanol exposure group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, significant difference between groups as revealed by FPLSD.

behavioral [8,9,38] and neurochemical alterations including nicotinic receptors upregulation [65,88], altered monoamine levels and metabolism [37,91,102] as well as altered expression of genes implicated in synaptic plasticity induced by drugs of abuse [57]. This strain of mice is known to present particular features, such as higher voluntary ethanol consumption [27], which should be taken into consideration in studies that involve the administration of this substance, even though the bases underlying these strain-specific characteristics remain poorly understood [26]. As a result, generalizations should be made with care. In spite of the peculiarities of this strain, significant differences between groups were observed in our study. This fact clearly indicates that there is some fundamental aspect of the neurobiology of these animals that has been differentially affected by the treatment, which should be amenable to further investigation. Accordingly, future studies on the biological bases of ethanol and nicotine interactions are necessary and the use of other strains and species may provide valuable data.

The nicotine concentration used in the drinking solution in the present study yields, after absorption from the buccal cavity, cotinine plasma levels [50,51,88] that are comparable to those found in adolescent smokers [16,18,107]. Regarding ethanol, previous studies in adolescent rodents demonstrated that the moderate doses used in the present study result in blood levels well above the legal driving limit [55,67,82]. In any case, since nicotine/cotinine and ethanol plasma levels were not specifically assessed in the present study, it is conceivable that small variations in their plasma levels constitute one factor that may explain the fact that the behavioral effects observed in our study differs from some of the results observed in previous studies. Since ethanol plasma levels are reduced in animals concomitantly exposed to nicotine [24,64,81,39], it could be argued that effects of the combined exposure to nicotine and ethanol described in the present study were due to a nicotine-elicited reduction in ethanol plasma levels. However, this reduction was only described in animals that received oral ethanol, and seemed to be due to a nicotine-induced delay in gastric emptying [24,64,81,39], leading to an increased ethanol metabolism by the gastric alcohol dehydrogenase [66]. It has also been demonstrated that both i.v. [47] and i.p. [67] ethanol concentrations are not affected by chronic nicotine exposure. Accordingly, metabolic nicotine-ethanol interactions do not seem to be capable of explaining our current findings. In fact, additional evidence indicates that nicotine-ethanol interactions do not have a pharmacokinetic origin since nicotine does not affect the elimination rate of ethanol and *vice versa* [25].

Considering that memory/learning effects may be dependent on the dose of nicotine [76], differences in fluid intake/body weight between groups could have influenced the results. However, no consistent differences in fluid intake/body weight or nicotine consumption were observed between animals receiving the combined nicotine + ethanol treatment and those receiving nicotine alone. Taken together, our findings support the assumption that the interactive nicotine and ethanol results described in the present study cannot be explained by group differences in fluid intake/body weight or nicotine consumption.

4.2. Memory/learning effects during adolescent exposure

Nicotine administration during adulthood was shown to produce short-term enhancement of cognitive performance in both humans and rodents with peak effects seen during treatment [34,45,54,77], which has led to the suggestion that cognitive improvement plays a role in smoking maintenance. It is interesting that, in contrast, our results indicate that nicotine exposure during adolescence failed to elicit beneficial cognitive effects, in fact there was a trend toward significant cognitive deficits. Poorer working memory performance accuracy in adolescent smokers irrespective of how recently was tobacco used prior to testing was described recently [48]. These results provide further evidence that adolescents present peculiar responses to nicotine when compared to adults [3,7,84]. As for ethanol, our results are in line with a previous study [12] which showed that in order to demonstrate impaired performance in the passive avoidance task, ethanol had to be applied before each testing day. It should be reiterated that in the present study, mice were not under the acute effects of the drug during the testing sessions [67], which rule out the possibility that motor impairments could act as confounding factors.

Nicotine has been shown to inhibit ethanol-induced neurotoxicity in cultured cortical and cerebellar cells [94,96]. Furthermore, at adulthood, nicotine and ethanol co-administration was shown to result in one drug opposing the cognitive effect of the other [40,76,77,98]. Taken together, these findings suggest that the high incidence of smoking among alcoholics [30,79] can be due to nicotine's ability to reverse adverse effects of ethanol on cognitive functions [40,98]. In contrast, in the present study effects of the combined treatment reflected simple summation of nicotine and ethanol individual exposure effects, indicating that the detrimental effects on memory/learning thus represent a worsened outcome from the dual exposure. Accordingly, our present findings provide evidence for adolescence as a critical window for nicotine and ethanol interactions, with unique effects when compared to adulthood. As a result, it is possible to speculate that, during adolescent exposure, the association between tobacco and alcohol consumption cannot be explained by nicotine-elicited reversal of alcohol-induced impairment of performance.

4.3. Memory/learning effects during short-term withdrawal

As indicated by the memory/learning index, adolescent nicotine exposure improved memory and learning during a short-term withdrawal. This result is in accordance with previous Trauth et al. [100] findings of cognitive enhancement in the post-treatment period in rats, and indicates that, in contrast to continued smoking, smoking cessation is not associated with further deterioration in cognitive performance in adolescents. However, it has been recently shown by Jacobsen et al. [48], that adolescent daily tobacco smokers experience acute impairments of verbal and working memory during withdrawal. The differences between the aforementioned studies regarding the effects of nicotine on cognitive performance may reflect not only species-specific characteristics, but also the fact that the study

of Jacobsen et al. [48] tested adolescents during a 24 h withdrawal, while in the present study and in the study of Trauth et al. [100], longer periods of nicotine abstinence were used. Therefore, it is possible that a few days of withdrawal are necessary to disclose nicotine-elicited cognitive improvements associated to adolescent exposure. As for ethanol, even though previous studies by Barron et al. [14] and Sircar and Sircar [83] have shown that exposure to this drug in adolescent, but not adult rats, elicit long-term impairments on memory formation, it has also been shown that memory and learning are not affected during adolescent ethanol withdrawal [74]. Our present results are in line with the later finding since the decrease in cognitive performance in ethanol treated mice failed to reach significance. These findings suggest reversible changes in learning and memory and suggest that adolescents are less sensitive to decrements in cognitive performance elicited by ethanol withdrawal. The differences between our data and those of Barron et al. [14] and of Sircar and Sircar [83] can be related in part to the different experimental designs used to evaluate memory and learning: in contrast to these studies, in the present paper, mice were not under the acute effects of ethanol during the behavioral tests.

Despite the fact that during a short-term withdrawal, nicotine improved memory and learning, nicotine failed to elicit similar results when combined to ethanol. This result corroborates previous data that indicate contrasting cognition effects of nicotine and ethanol at adulthood [40,76,77,98], however, we again failed to find evidence that nicotine counteracts the adverse effects of ethanol [40,98]. In fact, our results suggest that, in contrast, adolescent ethanol administration blocks nicotine-induced memory/learning improvements, while it does not cause significant impairments on its own. Accordingly, during a short-term withdrawal, co-administration elicits a worsened outcome when compared to nicotine exposure alone.

4.4. Memory/learning effects during long-term withdrawal

In contrast to the effects elicited by either drug during exposure and short-term withdrawal, both nicotine and ethanol failed to cause effects on memory and learning 1 month after exposure. It is interesting that our results indicate that nicotine failed to elicit long-lasting effects, given that previous studies have reported that the cognitive improvement response elicited by nicotine may persist for weeks or months after adolescent nicotine treatment [100]. However, studies looking at long-term effects of nicotine when administered in adolescence have used a different route and schedule of administration. As for ethanol, cognitive deficits seem to be dependent on the pattern of exposure, since ethanol treatment for longer periods [35] and higher doses [104,68] were shown to produce permanent deficits and neural damage in rodents and humans.

In contrast to the lack of effect elicited by either drug when used separately, nicotine + ethanol co-administration caused a female-only improvement in cognitive performance, as indicated by the memory/learning index, 1 month after exposure, revealing a sex-dependent synergistic effect of nicotine and ethanol. As a matter of fact, to our knowledge, these results constitute the first experimental evidence that the co-administration

during adolescence elicit long-term cognitive effects after long-term withdrawal. In view of the sex difference described above, our results suggest that adolescent female mice are more susceptible to nicotine and ethanol-induced alterations in cognition. Although the mechanisms of nicotine and ethanol interaction are not fully understood, the synergistic effect in females suggests that both nicotine and ethanol share similar sites and/or mechanisms of action, however future studies are needed to determine which neurochemical changes are associated with these sex-dependent behavioral effects. One possibility is that female-only effects are hormone-dependent [29,92]. In fact, neuronal cell turnover and plasticity, and hence the effects of agents that affect cell replication, differentiation and neurite outgrowth, are responsive to estrogen [92].

Relapse to drug use could be due to worsened cognitive performance during withdrawal when compared to performance during exposure [46]. Considering the lack of effects during a short-term nicotine + ethanol withdrawal, the lack of persistent effects for males and the improved performance of female mice submitted to the combined treatments during long-term withdrawal, it is possible to speculate that the association between smoking and consumption of alcoholic beverages described in epidemiological studies [20,28,30,41,53,60] cannot be explained by cumulative persistent cognitive effects of nicotine and ethanol. If similar changes occur during smoking and alcoholic drinking withdrawal, memory and learning effects are probably not major factors that determine the combined nicotine and ethanol relapse to drug use.

4.5. Anxiety effects

The fact that the combined nicotine + ethanol exposure during adolescence increased defecation during the first contact with the passive avoidance apparatus suggests long-lasting alterations in emotional reactions, indicative of increased anxiety levels. Different paradigms have been proposed to measure different aspects of emotionality [72]. Indeed, long-term anxiogenic effects of the co-exposure to nicotine and ethanol during adolescence were also recently described in the elevated plus maze [1]. These results are corroborated by another study, which indicated that low doses of nicotine adversely affect extinction of freezing behavior in rodents [85], which implies a higher anxiety level in nicotine-exposed animals when compared to controls. It is conceivable that altered anxiety levels during the first contact with the testing apparatus could confound the analysis of the memory/learning component of the task. However, the analysis of the correlation coefficients between B/min and PA1 as well as between B/min and the (PA2 – PA1)/PA1 memory/learning index demonstrate that there were no associations between these variables. These findings indicate that anxiety levels during the first contact with the passive avoidance testing apparatus do not affect the learning/memory component of the task.

4.6. Neurobiology of nicotine and ethanol effects

Previous evidence indicates that the immature central cholinergic systems involved in memory, learning and psychostimulant

responses [58,61,108] are particularly vulnerable to central nervous system stimulants, such as nicotine [4,6] and ethanol [44,52]. Although there is evidence that nicotine affects other neurotransmitter systems [5,99], as an acetylcholine analog, the nicotinic acetylcholine receptors are the primary cellular mediators of nicotine's effects [4,6]. As for ethanol, it directly influences the function of various ligand-gated ion channels, including nicotinic receptors [21,33,43]. In fact, both nicotine [4,6,36] and ethanol [17] upregulate nicotinic cholinergic receptors in several brain regions. Furthermore, it has been demonstrated that ethanol modulates nicotine-induced upregulation of nicotinic cholinergic receptors [31], enhances agonist-induced ion flux through nicotinic receptors [10,19] and that ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine systems involves the activation of nicotinic receptors [87]. These findings indicate that the nicotinic receptor is a site at which nicotine and ethanol may interact.

There have been relatively few animal studies of the basic neurobiology of the combined nicotine and ethanol exposure, and while some studies suggest that nicotine has a modulatory effect on ethanol effects through its cholinergic actions, others show no marked interactions and still others show augmented effects [11,71,94,95]. The fact that both nicotine and ethanol target cholinergic systems raises the possibility of less-than-additive or synergistic interactions between the two treatments, and indeed, we observed synergistic effects during long-term withdrawal in females when the combined exposure improved memory/learning. Since it has been suggested that nicotinic cholinergic receptors play major roles in cognitive processes, such as memory and learning [63,70]. The role of cholinergic systems in memory and learning alterations associated with nicotine and ethanol adolescent exposure needs to be tested in subsequent studies.

5. Conclusions

The present study provides experimental evidence for functional interactions between nicotine and ethanol in the regulation of behavioral responses, particularly cognitive behavior in adolescent mice: during exposure, nicotine and ethanol elicit cumulative memory and learning deficits. During a short-term withdrawal, nicotine elicited memory/learning improvements while ethanol administration blocked these nicotine-induced effects, while not causing significant impairments on its own. Finally, although neither nicotine nor ethanol effects persisted up to 1 month post-exposure (PN74–75) when the drugs were used separately, a female-only improvement in memory/learning was observed as a result of the co-administration. In conclusion, our results suggest that detrimental effects of nicotine and ethanol on memory/learning during adolescent exposure represent a worsened outcome from the dual exposure. However, negative effects of the combined exposure failed to persist during withdrawal. In fact, the combined exposure elicited a sex-dependent late onset beneficial effect on memory/learning during withdrawal. Our results suggest that adolescence is the best time to implement cessation interventions since drug exposure restricted to this period, in contrast to exposure that

extends into adulthood, fails to produce long-lasting detrimental effects.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Philip Morris USA Inc. and Philip Morris International, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-BRAZIL) and by fellowships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ-BRAZIL) and Sub-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR2-UERJ). The authors are thankful to Armando Meyer for helpful comments and to Edson Oliveira for animal care.

References

- Abreu-Villaça Y, Nunes F, Queiroz-Gomes FE, Lima CS, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short term and long term withdrawal. *Neuropsychopharmacology*. 2007; doi:10.1038/sj.npp.1301429.
- Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes FE, Dal Monte AP, Filgueiras CC, Manhães AC. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57Bl/6 mice. *Behav Brain Res* 2006;167:175–82.
- Abreu-Villaça Y, Seidler F, Slotkin TA. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology* 2004;29:1440–50.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Qiao D, Tate CA, Cousins MM, Thillai I, et al. 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.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Slotkin TA. Impact of adolescent nicotine exposure on adenylyl cyclase-mediated cell signaling: enzyme induction, neurotransmitter-specific effects, regional selectivities, and the role of withdrawal. *Brain Res* 2003;988:164–72.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. Prenatal nicotine exposure alters the response to nicotine administration in adolescence: effects on cholinergic systems during exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:879–90.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Tate CA, Slotkin TA. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Res* 2003;979:114–28.
- Adriani W, Granstrem O, Macri S, Izykenova G, Dambinova S, Laviola G. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:869–78.
- Adriani W, Macri S, Pacifici R, Laviola G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology* 2002;27:212–24.
- Astrup GL, Marszalec W, Narahashi T. Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol* 1999;55:39–49.
- Bachtell RK, Ryabinin AE. Interactive effects of nicotine and alcohol co-administration on expression of inducible transcription factors in mouse brain. *Neuroscience* 2001;103:941–54.
- Bammer G, Chesher GB. An analysis of some effects of ethanol on performance in a passive avoidance task. *Psychopharmacology (Berl)* 1982;77:66–73.
- Bardo MT, Dwoskin LP. Biological connection between novelty- and drug-seeking motivational systems. *Nebr Symp Motiv* 2004;50:127–58.
- Barron S, White A, Swartzwelder HS, Bell RL, Rodd ZA, Slawecski CJ, et al. Adolescent vulnerabilities to chronic alcohol or nicotine exposure: findings from rodent models. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:1720–5.
- Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 1982;216:890–2.
- Binnie V, McHugh S, Macpherson L, Borland B, Moir K, Malik K. The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine. *Oral Dis* 2004;10:287–93.
- Booker TK, Collins AC. Long-term ethanol treatment elicits changes in nicotinic receptor binding in only a few brain regions. *Alcohol* 1997;14:131–40.
- Caraballo RS, Giovino GA, Pechacek TF. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine Tob Res* 2004;6:19–25.
- Cardoso RA, Brozowski SJ, Chavez-Noriega LE, Harpold M, Valenzuela CF, Harris RA. Effects of ethanol on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:774–80.
- Carmody TP, Brischetto CS, Matarazzo JD, O'Donnell RP, Connor WE. Co-occurrence of cigarettes, alcohol, and coffee in healthy, community-living men and women. *Health Psychol* 1985;4:323–35.
- Castaneda R, Sussman N, Westreich L, Levy R, O'Malley M. A review of the effects of moderate alcohol intake on the treatment of anxiety and mood disorders. *J Clin Psychiatry* 1996;57:207–12.
- Centers for Disease Control Prevention. Trends in cigarette smoking among high school students: United States 1991–1999. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:755–8.
- Chen J, Millar WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep* 1998;9:39–46.
- Chen WJ, Harle LK. Interactive effect of alcohol and nicotine on developing cerebellum: an investigation of the temporal pattern of alcohol and nicotine administration. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:437–42.
- Collins AC, Burch JB, de Fiebre CM, Marks MJ. Tolerance to and cross tolerance between ethanol and nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;29:365–73.
- Crabbe JC, Phillips TJ, Buck KJ, Cunningham CL, Belknap JK. Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. *Trends Neurosci* 1999;22:173–9.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, et al. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;132:107–24.
- Dawson DA. Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend* 2000;59:235–49.
- Dazzi L, Seu E, Cherchi G, Barbieri PP, Matzeu A, Biggio G. Estrous cycle-dependent changes in basal and ethanol-induced activity of cortical dopaminergic neurons in the rat. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:892–901.
- DiFranza JR, Guarrera MP. Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol* 1990;51:130–5.
- Dohrman DP, Reiter CK. Ethanol modulates nicotine-induced upregulation of nAChRs. *Brain Res* 2003;975:90–8.
- Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP. Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: effects of social isolation. *Physiol Behav* 2003;80.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, et al. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:998–1040.
- Ernst M, Heishman SJ, Spurgeon L, London ED. Smoking history and nicotine effects on cognitive performance. *Neuropsychopharmacology* 2001;25:313–9.
- Farr SA, Scherrer JF, Banks WA, Flood JF, Morley JE. Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:971–82.
- Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits and is upregulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol* 1992;41:31–7.

- [37] Gaddnas H, Pietila K, Ahtee L. Effects of chronic oral nicotine treatment and its withdrawal on locomotor activity and brain monoamines in mice. *Behav Brain Res* 2000;113.
- [38] Gaddnas H, Pietila K, Piepponen TP, Ahtee L. Enhanced motor activity and brain dopamine turnover in mice during long-term nicotine administration in the drinking water. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70:497–503.
- [39] Gilbertson RJ, Barron S. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweaning animals. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81:54–64.
- [40] Gould TJ, Lommock JA. Nicotine enhances contextual fear conditioning and ameliorates ethanol-induced deficits in contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 2003;117:1276–82.
- [41] Grant BF. Age at smoking onset and its association with alcohol consumption and DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the national longitudinal alcohol epidemiologic survey. *J Subst Abuse* 1998;10:59–73.
- [42] Grant GF. The impact of a family history of alcoholism on the relationship between age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol dependence: results of the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *Alcohol Health Res World* 1998;22:144–7.
- [43] Grant KA. Emerging neurochemical concepts in the actions of ethanol at ligand-gated ion channels. *Behav Pharmacol* 1994;5:383–404.
- [44] Heaton MB, Swanson DJ, Paiva M, Walker DW. Influence of prenatal ethanol exposure on cholinergic development in the rat striatum. *J Comp Neurol* 1996;364:113–20.
- [45] Hefco V, Yamada K, Hefco A, Hritcu L, Tiron A, Nabeshima T. The interaction between the cholinergic and dopaminergic system in learning and memory process in rats. *Rom J Physiol* 2004;41:21–30.
- [46] Heishman SJ. Behavioral and cognitive effects of smoking: relationship to nicotine addiction. *Nicotine Tob Res* 1999;1:S143–7 [discussion S165–146].
- [47] Hisaoka M, Levy G. Kinetics of drug action in disease states XI: effect of nicotine on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of phenobarbital and ethanol in rats. *J Pharm Sci* 1985;74:412–5.
- [48] Jacobsen LK, Krystal JH, Mencl WE, Westerveld M, Frost SJ, Pugh KR. Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco smokers. *Biol Psychiatry* 2005;57:56–66.
- [49] Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG. National survey results on drug use from the monitoring the future study, 1975–2000. NIH Publication Number 01-4924. Bethesda, MD: Department of Health and Human Services; 2001. p. 1.
- [50] Klein LC, Stine MM, Pfaff DW, Vandenberg DJ. Maternal nicotine exposure increases nicotine preference in periadolescent male but not female C57BL/6J mice. *Nicotine Tob Res* 2003;5:117–24.
- [51] Klein LC, Stine MM, Vandenberg DJ, Whetzel CA, Kamens HM. Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;78:13–25.
- [52] Kristofikova Z, Platilova V, Klaschka J. Age- and sex-dependent effects of ethanol on hippocampal hemicholinium-3 sensitive choline carriers during postnatal development of rats. *Neurochem Res* 2003;28:397–405.
- [53] Larsson A, Engel JA. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;27:713–20.
- [54] Levin ED, Rezvani AH. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol* 2000;393:141–6.
- [55] Lopez M, Simpson D, White N, Randall C. Age- and sex-related differences in alcohol and nicotine effects in C57BL/6J mice. *Addict Biol* 2003;8:419–27.
- [56] Macri S, Adriani W, Chiarotti F, Laviola G. Risk-taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Anim Behav* 2002;64:541–6.
- [57] Marttila K, Raattamaa H, Ahtee L. Effects of chronic nicotine administration and its withdrawal on striatal FosB/DeltaFosB and c-Fos expression in rats and mice. *Neuropharmacology* 2006;51:44–51.
- [58] Matthews DA, Nadler JV, Lynch GS, Cotman CW. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. *Dev Biol* 1974;36:130–41.
- [59] McWilliams JR, Lynch G. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science* 1983;221:572–4.
- [60] Miller NS, Gold MS. Comorbid cigarette and alcohol addiction: epidemiology and treatment. *J Addict Dis* 1998;17:55–66.
- [61] Nadler JV, Matthews DA, Cotman CW, Lynch GS. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. II. Quantitative changes in choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Dev Biol* 1974;36:142–54.
- [62] National Institute on Drug Abuse. Nicotine Addiction, NIH Publication Number 98-4342. Washington, DC; 1998. 7 pp.
- [63] Nordberg A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 2001;49:200–10.
- [64] Nowak A, Jonderko K, Kaczor R, Nowak S, Skrzypek D. Cigarette smoking delays gastric emptying of a radiolabelled solid food in healthy smokers. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:54–8.
- [65] Nuutinen S, Ahtee L, Tuominen RK. Time and brain region specific up-regulation of low affinity neuronal nicotinic receptors during chronic nicotine administration in mice. *Eur J Pharmacol* 2005;515:83–9.
- [66] Oneta CM, Simanowski UA, Martinez M, Allali-Hassani A, Parés X, Homann N, et al. First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric emptying. *Gut* 1998;43:612–9.
- [67] Parnell SE, West JR, Chen WJ. Nicotine decreases blood alcohol concentrations in adult rats: a phenomenon potentially related to gastric function. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:1408–13.
- [68] Parsons OA, Nixon SJ. Cognitive functioning in sober social drinkers: a review of the research since 1986. *J Stud Alcohol* 1998;59:180–90.
- [69] Pascual M, Blanco AM, Cauli O, Minarro J, Gueri C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci* 2007;25:541–50.
- [70] Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 2000;61:75–111.
- [71] Penland S, Hoplight B, Obernier J, Crews FT. Effects of nicotine on ethanol dependence and brain damage. *Alcohol* 2001;24:45–54.
- [72] Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport* 2002;13:1097–106.
- [73] Pierce JP, Gilpin E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *Am J Pub Health* 1996;86:253–6.
- [74] Popovic M, Caballero-Bleda M, Puelles L, Gueri C. Multiple binge alcohol consumption during rat adolescence increases anxiety but does not impair retention in the passive avoidance task. *Neurosci Lett* 2004;357:79–82.
- [75] Rakic P, Bourgeois JP, Goldman-Rakic PS. Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Prog Brain Res* 1994;102:227–43.
- [76] Rezvani AH, Levin ED. Nicotine-alcohol interactions and cognitive function in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;72:865–72.
- [77] Rezvani AH, Levin ED. Nicotine-alcohol interactions and attentional performance on an operant visual signal detection task in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;76:75–83.
- [78] Rhodes MC, Seidler FJ, Qiao D, Tate CA, Cousins MM, Thillai I, et al. Does pharmacotherapy for preterm labor sensitize the developing brain to environmental neurotoxins? Cellular and synaptic effects of sequential exposure to terbutaline and chlorpyrifos in neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;195:203–17.
- [79] Romberger DJ, Grant K. Alcohol consumption and smoking status: the role of smoking cessation. *Biomed Pharmacother* 2004;58:77–83.
- [80] Scheetz AJ, Constantine-Paton M. Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J* 1994;8:745–52.
- [81] Scott AM, Kellow JE, Shuter B, Nolan JM, Hoschl R, Jones MP. Effects of cigarette smoking on solid and liquid intragastric distribution and gastric emptying. *Gastroenterology* 1993;104:410–6.
- [82] Silveri MM, Spear LP. Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol* 2000;20:45–53.

- [83] Sircar R, Sircar D. Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:1402–10.
- [84] Slotkin TA. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol Teratol* 2002;24:369–84.
- [85] Smith LN, McDonald CG, Bergstrom HC, Brielmaier JM, Eppolito AK, Wheeler TL, et al. Long-term changes in fear conditioning and anxiety-like behavior following nicotine exposure in adult versus adolescent rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85:91–7.
- [86] Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods*. 6th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1967.
- [87] Soderpalm B, Ericson M, Olausson P, Blomqvist O, Engel JA. Nicotinic mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol. *Behav Brain Res* 2000;113:85–96.
- [88] Sparks JA, Pauly JR. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57B1/6 mice. *Psychopharmacology* 1999;141:145–53.
- [89] Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:417–63.
- [90] Spear LP. The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *J Stud Alcohol Suppl* 2002;14:71–81.
- [91] Tammimäki A, Pietila K, Raattamaa H, Ahtee L. Effect of quinpirole on striatal dopamine release and locomotor activity in nicotine-treated mice. *Eur J Pharmacol* 2006;531:118–25.
- [92] Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 1999;19:5792–801.
- [93] Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Dev Brain Res* 1995;89:167–72.
- [94] Tizabi Y, Al-Namaeh M, Manaye KF, Taylor RE. Protective effects of nicotine on ethanol-induced toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Neurotox Res* 2003;5:315–21.
- [95] Tizabi Y, Copeland RLJ, Louis VA, Taylor RE. Effects of combined systemic alcohol and central nicotine administration into ventral tegmental area on dopamine release in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:394–9.
- [96] Tizabi Y, Manaye KF, Smoot DT, Taylor RE. Nicotine inhibits ethanol-induced toxicity in cultured cerebral cortical cells. *Neurotox Res* 2004;6:311–6.
- [97] Tokunaga S, Silvers JM, Matthews DB. Chronic intermittent ethanol exposure during adolescence blocks ethanol-induced inhibition of spontaneously active hippocampal pyramidal neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:1–6.
- [98] Tracy HA, Wayner MJ, Armstrong DL. Nicotine blocks ethanol and diazepam impairment of air righting and ethanol impairment of maze performance. *Alcohol* 1999;18:123–30.
- [99] Trauth JA, Seidler FJ, Ali SF, Slotkin TA. Adolescent nicotine exposure produces immediate and long-term changes in CNS noradrenergic and dopaminergic function. *Brain Res* 2001;892:269–80.
- [100] Trauth JA, Seidler FJ, Slotkin TA. Persistent and delayed behavioral changes after nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res* 2000;880:167–72.
- [101] Vanderschuren LJ, Niesink RJ, Van Ree JM. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:309–26.
- [102] Vihavainen T, Mijatovic J, Piepponen TP, Tuominen RK, Ahtee L. Effect of morphine on locomotor activity and striatal monoamine metabolism in nicotine-withdrawn mice. *Behav Brain Res* 2006;173:85–93.
- [103] White AM, Ghia AJ, Levin ED, Swartzwelder HS. Binge pattern ethanol exposure in adolescent and adult rats: differential impact on subsequent responsiveness to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1251–6.
- [104] White AM, Swartzwelder HS. Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. *Ann NY Acad Sci* 2004;1021:206–20.
- [105] White AM, Swartzwelder HS. Age-related effects of alcohol on memory and memory-related brain function in adolescents and adults. *Recent Dev Alcohol* 2005;17:161–76.
- [106] Wills TA, Vaccaro D, McNamara G. Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse* 1994;6:1–20.
- [107] Wood T, Wewers ME, Groner J, Ahijevych K. Smoke constituent exposure and smoking topography of adolescent daily cigarette smokers. *Nicotine Tob Res* 2004;6:853–62.
- [108] Zahalka E, Seidler FJ, Lappi SE, Yanai J, Slotkin TA. Differential development of cholinergic nerve terminal markers in rat brain regions: implications for nerve terminal density, impulse activity and specific gene expression. *Brain Res* 1993;601:221–9.
- [109] Zeigler DW, Wang CC, Yoast RA, Dickinson BD, McCaffree MA, Robinson CB, et al. The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students. *Prev Med* 2005;40:23–32.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)