



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

Andréia Oliveira da Silva

EFEITOS DA NICOTINA E/OU ETANOL NO HIPOCAMPO DE
CAMUNDONGOS ADOLESCENTES: MORTE CELULAR E
DENSIDADE NEURONAL E GLIAL AO FINAL DA EXPOSIÇÃO E
APÓS A RETIRADA DAS DROGAS

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Andréia Oliveira da Silva

EFEITOS DA NICOTINA E/OU ETANOL NO HIPOCAMPO DE
CAMUNDONGOS ADOLESCENTES: MORTE CELULAR E
DENSIDADE NEURONAL E GLIAL AO FINAL DA EXPOSIÇÃO E
APÓS A RETIRADA DAS DROGAS

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de
Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia
Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio
de Janeiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yael de Abreu Villaça
Co-orientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Rio de Janeiro
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CBio

S586 Silva, Andréia Oliveira da.
Efeitos da nicotina e/ou etanol no hipocampo de camundongos
adolescentes: morte celular e densidade neuronal e glial ao final da
exposição e após a retirada das drogas / Andréia Oliveira da Silva.-
2009.
xvi, 155f. : il.

Orientador : Yael de Abreu Villaça.
Co-orientador : Alex Christian Manhães.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em
Fisiopatologia Clínica e Experimental.
Bibliografia: f. 98-119.

1. Adolescentes - Teses. 2. Nicotina - Teses. 3. Etanol -
Teses. 4. Apoptose - Teses. 5. Camundongo - Morfologia -
Teses. 6. Hipocampo (Cérebro) - Teses. 7. Camundongo como
animal de laboratório - 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

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

Andréia Oliveira da Silva

Efeitos da nicotina e/ou etanol no hipocampo de camundongos
adolescentes: morte celular e densidade neuronal e glial ao final da
exposição e após a retirada das drogas

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de
Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia
Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio
de Janeiro

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Yael de Abreu Villaça (Orientador)
IBRAG – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Jesus Landeira Fernandez
Centro de Teologia e Ciências Humanas/Dep. de Psicologia – PUC/RIO

Prof. Dr. João Ricardo de Lacerda Menezes
Instituto de Ciências Biomédicas/Dep. de Anatomia – UFRJ

Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz
IBRAG – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos
IBRAG – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2009

DEDICATÓRIA

Aos dois grandes amores da minha vida: Julianna – o amor que dura a eternidade e Luis Antonio – o amor que é eterno enquanto dura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a uma força interior que sempre me guia para frente e me conduz aos meus objetivos finais.

Agradeço aos meus pais Maria de Lourdes e Maurílio que com sua simplicidade e coragem me ensinaram que o melhor caminho é o da educação. Mãe! Pai! Vocês são verdadeiros Super Heróis!!!

Aos meus irmãos de sangue e de caminhada: Paulo Marconi – que me ensinou o valor da perseverança; Marília – que me ensinou o valor da humildade; Marilúcia – que me ensinou o valor do altruísmo; Anselmo – que me ensinou o valor da sabedoria; Adilson – que me ensinou o valor da fraternidade e Adriana – que espero ensinar alguma coisa de valor. Juntos compartilhamos momentos intensos e inesquecíveis.

Aos amigos e companheiros da Faculdade de Formação de Professores pelo apoio e incentivo na realização desse trabalho.

Ao professor Egberto Gaspar de Moura que me abriu as portas da Pós-Graduação em Fisiopatologia.

A minha querida orientadora Yael de Abreu Villaça por ter me apoiado e orientado nas inúmeras dúvidas e incertezas para a elaboração dessa tese, com sua sabedoria foi me mostrando o melhor caminho a seguir durante a realização deste trabalho.

Aos professores Alex Christian e Cláudio Filgueiras pelas orientações nas horas mais necessitadas e por me salvar de tantos apuros no Laboratório de Neurofisiologia. Agradeço também pelas dicas sempre bem vindas nas horas de desespero e pelos momentos agradáveis na sala dos alunos.

Às amigas de laboratório: Mabelzinha, Fernanda Queridoca, Carlitcha e Moniqua, vocês são todas mulherzinhas!!!! Aos queridos amigos Anderson, Ulisses e André pelo apoio e carinho durante toda a realização desse trabalho. Às várias Juli e Anas e à Dani pelos momentos alegres no cotidiano do laboratório e aos demais membros do grupo que tornaram a convivência mais agradável e a pesquisa mais interessante.

Um agradecimento muito especial à Fabiana Cristina Rodrigues que com sua ajuda e companheirismo tornou possível o término desse trabalho!!

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento pelas incontáveis horas passadas juntos na captura de imagens “perfeitas” no microscópio.

Aos amigos de longa data que acompanharam a jornada da minha vida: Ana Paula, Márcia, Luciene, Denise, Cláudio, Eduardo, Jack, Lucilia, Rozana e Ronaldo (*in memoriam*). Obrigada pelo carinho e amizade. Com vocês aprendi muitas coisas e graças a vocês sou uma pessoa melhor do que era algum tempo atrás.

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho de sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e também suas virtudes e vitórias e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua vida com a finalidade de colher boas flores e bons frutos ao longo do caminho”.

Willian Shakespeare

RESUMO

OLIVEIRA-DA-SILVA, A. *Efeitos da nicotina e/ou etanol no hipocampo de camundongos adolescentes: morte celular e densidade neuronal e glial ao final da exposição e após a retirada das drogas*. Brasil. 2009. 155 f.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 2009.

Fumar e consumir bebidas alcoólicas estão frequentemente associados durante a adolescência. Contudo, poucos estudos em modelos animais têm como foco as bases neurobiológicas da exposição combinada à nicotina e ao etanol no cérebro de adolescentes. Nesse estudo investigamos morte celular e alterações na densidade neuronal e glial nas regiões granulosa do giro denteado (GrDG), camada moleuclar (Mol), CA1, CA2 e CA3 do hipocampo, durante a exposição e dois e cinco dias após o seu término. Para tanto, do 30º ao 45º dia pós-natal (PN30-PN45), 233 camundongos C57BL/6 machos e fêmeas foram expostos à nicotina (NIC) e/ou etanol (ETOH). Assim, quatro grupos experimentais foram utilizados: 1) NIC+ETOH: exposição concomitante a NIC (50µg/ml em 2% de sacarina na água de beber) e ETOH (25%, 2g/kg i.p. em dias alternados), 2) exposição à NIC, 3) exposição ao ETOH, 4) exposição ao veículo. Avaliamos morte celular por apoptose pela técnica do TUNEL, densidades neuronal e glial pelo método do Disector óptico e espessuras das regiões durante a exposição (PN45) e dois (PN47) e cinco dias (PN50) após o seu término. ANOVAs foram utilizadas para detectar efeitos do tratamento e/ou interações do tratamento com outros fatores. O grau de significância assumido foi de $p < 0.05$. Em PN45, a exposição ao etanol aumentou o número de células TUNEL+ em todas as regiões hipocâmpais quando comparado ao grupo veículo e a nicotina provocou uma resposta menos severa e dependente da região. Os animais que receberam nicotina+etanol não diferiram dos animais veículo em todas as regiões hipocâmpais. Em PN47, ainda foi identificado aumento no número de células TUNEL+ nos grupos ETOH e NIC, mas em menor magnitude que os efeitos identificados durante a exposição. Esses resultados foram acompanhados por redução das densidades neuronal e glial em todos os grupos tratados. Em PN50, a abstinência de nicotina e/ou etanol foi associada com reduções compensatórias de células TUNEL+ em todas as regiões hipocâmpais quando comparados com o grupo veículo e com a recuperação das densidades neuronal e glial. Não houve alterações nas espessuras das regiões nas três idades analisadas. Esses resultados sugerem que os efeitos deletérios da nicotina e/ou etanol durante a exposição e/ou da abstinência são revertidos durante a abstinência prolongada.

Palavras chave: adolescente, nicotina, etanol, apoptose, morfologia, hipocampo

ABSTRACT

Effects of nicotine and/or ethanol in the hippocampus of adolescent mice: cell death and neuronal and glial densities at the end of exposure and during drugs withdrawal.

Smoking and consumption of alcoholic beverages are frequently associated during adolescence. However, there have been few animal studies on the neurobiological bases of the combined exposure in the adolescent brain. In the present study, we investigated the effects of adolescent nicotine and/or ethanol exposure and withdrawal on the following regions of the hippocampus: Granular layer of the Dentate Gyrus (GrDG), Molecular layer (Mol), CA1, CA2 and CA3. From the 30th to the 45th postnatal day (PN30-PN45), 233 C57BL/6 male and female mice were exposed to nicotine free base (NIC) and/or ethanol (ETOH). Four groups were analyzed: 1) concomitant NIC (50 µg/ml in 2% saccharin to drink) and ETOH (25%, 2 g/kg i.p. injected every other day) exposure; 2) NIC exposure; 3) ETOH exposure; 4) vehicle. We evaluated cell degeneration (TUNEL assay), neuronal and glial densities (optical Disector) and region thicknesses during the exposure (PN45) and two (PN47) and five (PN50) days post-exposure. ANOVAs were used to identify treatment effects and/or interactions with other factors. Significance was assumed at the level of $p < 0.05$. On PN45, ETOH elicited an increase in the number of TUNEL+ cells relative to the vehicle group in all hippocampal regions. NIC elicited less severe region-dependent effects. Concomitant NIC and ETOH failed to elicit significant changes in the number of TUNEL+ cells. On PN47, the effects were similar to those described for PN45, even though smaller in magnitude. These results were paralleled by reductions in neuronal and glial cells densities for all treatment groups. In contrast, on PN50, ethanol and/or nicotine withdrawal were associated with compensatory reductions in TUNEL+ cells in all hippocampal regions. These results were paralleled by a reversal of effects on neuronal and glial densities. There were no effects on region thicknesses both during exposure and withdrawal. These results suggest that deleterious effects of nicotine and/or ethanol are reversed during prolonged withdrawal.

Key words: adolescent, nicotine, ethanol, apoptosis, morphology, hippocampus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
FIGURA 1	Médias dos valores de peso de fêmeas e machos	57
FIGURA 2	Médias de ingesta/peso de fêmeas e machos	58
FIGURA 3	Nº de células marcadas pelo TUNEL no final da exposição (PN45)	61
FIGURA 4	Fotomicrografias de células apoptóticas marcadas pelo TUNEL na camada CA3 ao final da exposição (PN45)	62
FIGURA 5	Densidade neuronal nas regiões hipocâmpais ao final do período de exposição (PN45)	63
FIGURA 6	Densidade glial nas regiões hipocâmpais ao final do período de exposição (PN45)	64
FIGURA 7	Fotomicrografias representativas de um par de Disector da região CA1 do hipocampo de camundongo do grupo veículo ao final do período de exposição (PN45)	65
FIGURA 8	Espessuras das regiões hipocâmpais estudadas ao final do período de exposição (PN45)	66
FIGURA 9	Nº de células marcadas pelo TUNEL dois dias após a retirada da nicotina e/ou etanol (PN47)	69
FIGURA 10	Fotomicrografias de células apoptóticas marcadas pelo TUNEL na camada CA1 dois dias após a exposição (PN47)	70
FIGURA 11	Nº de células marcadas pelo TUNEL cinco dias após a retirada da nicotina e/ou etanol (PN50)	71
FIGURA 12	Fotomicrografias de células apoptóticas marcadas pelo TUNEL na camada CA1 cinco dias após a exposição (PN50)	72
FIGURA 13	Densidade neuronal nas regiões hipocâmpais dois dias após a retirada do tratamento (PN47)	74
FIGURA 14	Densidade neuronal nas regiões hipocâmpais cinco dias após a retirada do tratamento (PN50)	75
FIGURA 15	Densidade glial nas regiões hipocâmpais dois dias após a retirada do tratamento (PN47)	76
FIGURA 16	Densidade glial nas regiões hipocâmpais cinco dias após a retirada do tratamento (PN50)	77
FIGURA 17	Espessuras das regiões hipocâmpais estudadas dois dias após a retirada do tratamento (PN47)	78
FIGURA 18	Espessuras das regiões hipocâmpais estudadas cinco dias após a retirada do tratamento (PN50)	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Protocolo para coloração de TUNEL ajustado e utilizado pelo Lab de Neurofisiologia IBRAG/UERJ.

TABELA 2 – Razão entre células gliais/neurônios após o término da exposição

TABELA 3 – Razão entre células gliais/neurônios com dois e cinco dias de abstinência

LISTA DE ABREVIATÖES

ANOVA	análise de variância
CA1	região dorsalmente localizada no <i>Cornu Ammonis</i> do hipocampo
CA2	região localizada entre as regiões CA1 e CA3 do hipocampo
CA3	região ventralmente localizada no <i>Cornu Ammonis</i> do hipocampo
F	valor do F de Fisher
GrDG	camada granulosa do giro denteado do hipocampo
FPLSD	Fisher's protected least significant difference
Mol	camada molecular do hipocampo
nAChRs	receptores nicotínicos acetilcolínicos
P	valor de prova
rANOVA	análise de variância com repetição
PN45	45º dia de vida pós-natal
PN47	47º dia de vida pós-natal
PN50	50º dia de vida pós-natal
TUNEL	técnica de imunomarcacão pelo terminal 3'-OH do DNA pela desoxinucleotidil transferase

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
I – INTRODUÇÃO	19
1 – ADOLESCÊNCIA	19
2 – TABACO vs. NICOTINA	22
2.1 – Aspectos Gerais	22
2.2 – Aspectos Farmacológicos	24
2.3 – Alterações morfológicas	27
3 – ETANOL	29
3.1 – Aspectos Gerais	29
3.2 – Aspectos Farmacológicos	33
3.3 – Alterações morfológicas	35
4 – INTERAÇÕES ENTRE NICOTINA E ETANOL	36
5 – APOPTOSE	40
6 – ESTEREOLOGIA	41
7 – HIPOCAMPO	43
8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
II – OBJETIVOS	47
III – MATERIAIS E MÉTODOS	48
1 – Formação dos grupos experimentais	48
2 – Ingesta de líquido, peso corporal e ingesta/peso	50
3 – Análise Morfológica	50
4 – Detecção de células apoptóticas	51
5 – Estereologia	53
6 – Razão Glia/Neurônio	54
7 – Espessura Hipocampal	54
8 – Análise estatística	55
IV – RESULTADOS	57
1 – Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência na ingesta de líquido/peso corporal e peso corporal dos animais tratados	58
1.1 – Efeitos sobre o peso corporal	58
1.2 – Efeitos sobre a ingesta de líquido/peso corporal	58

2 – Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência no final do período de tratamento (PN45)	62
2.1 – Morte celular por apoptose	62
2.2 – Densidade neuronal	65
2.3 – Densidade glial	66
2.4 – Razão entre células gliais/neurônios	68
2.5 – Espessuras das regiões	68
3 – Exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência: efeitos dois (PN47) e cinco dias (PN50) após o término do tratamento	70
3.1 – Morte celular por apoptose – Análise global	70
3.1.1 – Morte celular em PN47	70
3.1.2 – Morte celular em PN50	73
3.2 – Densidade neuronal – Análise global	75
3.2.1 – Densidade neuronal em PN47	75
3.2.2 – Densidade neuronal em PN50	77
3.3 – Densidade glial – Análise global	77
3.3.1 – Densidade glial em PN47	78
3.3.2 – Densidade glial em PN50	79
3.4 – Razão entre células gliais/neurônios	79
3.5 – Espessura das regiões	80
V – DISCUSSÃO	82
1 – Considerações metodológicas	82
2 – Alterações no peso corporal e na ingestão de líquido/peso corporal	86
3 – Efeitos da nicotina e/ou etanol no hipocampo	86
3.1 – Danos hipocámpais provocados pela nicotina	86
3.2 – Danos hipocámpais provocados pelo etanol	89
3.3 – Danos hipocámpais provocados pela nicotina+etanol	91
3.4 – Razão entre células gliais/neurônios	94
3.5 – Espessura das regiões	94
4 – Considerações finais	95
VI – CONCLUSÕES	97
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
VIII – ANEXO	120

Artigo 1

OLIVEIRA-DA-SILVA A, VIEIRA FB, CRISTINA-RODRIGUES F, FILGUEIRAS CC, MANHÃES AC, ABREU-VILLAÇA Y.

“Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice”.
Int J Dev Neurosci. 2009 Oct;27(6):539-48

Artigo 2

OLIVEIRA-DA-SILVA A; MANHÃES AC, CRISTINA-RODRIGUES F; FILGUEIRAS CC; ABREU-VILLAÇA Y.

“Hippocampal Increased Cell death and Decreased Cell Density Elicited by Nicotine and/or Ethanol during Adolescence are Reversed with Prolonged Drug Withdrawal”
Neuroscience. 2009 (submetido)

I – INTRODUÇÃO

1 – ADOLESCÊNCIA

Adolescência é um período de transição entre a infância e a maturidade. Adolescente é o indivíduo que encara o paradigma entre o deixar de ser criança para se tornar um adulto. Em indivíduos humanos, é um período de intensas mudanças psicossociais e biológicas e que varia muito entre os próprios adolescentes e entre os sexos também (Spear, 2000).

O limite temporal da adolescência não é de fácil definição. Em algumas espécies é difícil caracterizar quando a transição para adolescência começa a acontecer e quando o indivíduo passa de adolescente a adulto. Em roedores como ratos e camundongos, as primeiras alterações associadas à adolescência podem ocorrer já a partir do vigésimo dia de vida pós-natal e as últimas mudanças podem ocorrer até cinquenta e cinco dias após o nascimento (Spear, 2000). Em primatas não humanos, a adolescência ocorre geralmente entre dois e quatro anos de vida (Lewis et al., 1977); em humanos, a adolescência é comumente definida como a segunda década de vida (Petersen et al., 1996), além disso, alguns autores consideram idades acima de 25 anos “adolescência tardia” (Baumrind, 1987).

Adolescentes de várias espécies diferem comportamentalmente de indivíduos mais jovens e mais velhos. Estudos com roedores têm mostrado que adolescentes exibem diferenças quando comparados com adultos em relação a medidas de ansiedade, depressão e reatividade ao stress (Adriani et al., 2004, Slawecki e Ehlers, 2005). De fato, alguns estudos mostram que ratos adolescentes podem exibir níveis menores ou maiores de ansiedade em análises comportamentais quando comparados com adultos (Cheeta et al., 2001; Elliott et al., 2004, Genn et al., 2003). Durante adolescência, roedores apresentam elevados níveis de busca pela novidade (Adriani et al., 2002), impulsividade (Adriani et al., 2003) e comportamento de risco (Macri et al., 2002), assim como redução de resposta ao stress (Adriani e Laviola, 2000).

De modo geral, as alterações comportamentais observadas durante a adolescência são consistentes com a necessidade do adolescente de explorar novos domínios e estabelecer novas relações durante o processo de

independência dos pais (Spear, 2002). O aumento no valor atribuído pelo adolescente à interação social com indivíduos fora do círculo familiar contribui para promover a independência destes adolescentes em relação aos pais (Spear, 2000). O aumento do comportamento de risco é observado numa variedade de espécies e pode servir como oportunidade de explorar novos comportamentos e situações, o que por sua vez aumenta a probabilidade de experimentação de comportamentos propícios à repetição (*positive reinforcements*), os quais estão associados ao uso de drogas (Spear, 2002).

Alguns trabalhos começam a explicar porque os adolescentes podem se comportar “de forma madura na segunda e apresentar atitudes imprudentes na terça”, ou seja, apresentarem comportamentos instáveis. Neurocientistas têm descrito que o cérebro do adolescente está passando por uma remodelação que pode ser responsável pela propensão dos adolescentes a correr riscos, buscar novas experiências e pela dificuldade em impedir comportamentos imprudentes. Esta pode ser uma das razões pelas quais é três a quatro vezes mais provável morrer durante a adolescência quando comparada com a infância (Powell, 2006).

O cérebro apresenta maior grau de desenvolvimento durante a infância e relativa estabilidade na idade adulta, sendo seu desenvolvimento pontuado por rápidas transformações neurais durante a adolescência (Spear, 2000). Esta metamorfose do cérebro adolescente é caracterizada pela continuada maturação do sistema neural, que inclui a perda de aproximadamente metade do número de conexões sinápticas em algumas regiões neurais (Rakic et al., 1994), perda esta que pode servir para refinar as conexões e aumentar a eficiência cerebral durante a adolescência (Chugani et al., 1996).

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

Regiões neurais como o córtex pré-frontal e outras regiões de projeções dopaminérgicas do prosenencéfalo, apresentam alterações proeminentes durante a adolescência. Dada a importância dessas regiões cerebrais na modulação de

mecanismos de recompensa associados ao uso de drogas (Koob, 1992) e de respostas a agentes estressores (Dunn, 1984) e a associação entre ambos (Goeders, 1997; Piazza et al., 1991), não é surpresa constatar que adolescentes respondem de formas diferentes ao uso de drogas, à agentes estressores e a interação entre ambos, quando comparados com animais adultos ou mais maduros (Spear, 2002).

O córtex pré-frontal é uma área fortemente relacionada com habilidades cognitivas (Diamond, 1991). O volume do córtex pré-frontal diminui durante a adolescência tanto em humanos (Jernigan et al., 1991) quanto em ratos (Van Eden, 1990). Além disso, também foi demonstrada em humanos (Huttenlocher, 1984) e primatas não-humanos (Zecevic et al., 1989) a eliminação de sinapses no córtex pré-frontal e outras regiões corticais. Outros autores descrevem ainda um aumento de projeções dopaminérgicas no córtex pré-frontal de adolescentes humanos e ratos (Kalsbeek et al., 1988), decorrente da substancial reorganização que o sistema dopaminérgico sofre durante a adolescência.

A região dorsolateral do córtex pré-frontal, área relacionada ao controle de impulsos, também está sofrendo contínuos processos de mudanças durante a adolescência (Giedd, 2004, Sowell et al., 2001). Alterações relacionadas à maturação durante a adolescência também são evidentes em outras regiões cerebrais como hipotálamo e hipocampo de roedores (Dumas e Foster, 1998) e humanos (Benes, 1989). No hipocampo, há um crescimento exuberante de axônios excitatórios e as sinapses são morfologicamente remodeladas (Swann et al., 1999).

Por fim, pesquisas anteriores sugerem que alterações neurais e características comportamentais da adolescência são fatores associados à experimentação de vários tipos de agentes psicoativos. O uso de drogas na adolescência inicia-se por volta dos doze anos de idade e se estende até os dezoito anos. Começa com o uso de tabaco, mais tarde, o adolescente pode fazer uso de maconha e/ou álcool e/ou outras drogas opiáceas (Kandel et al., 1992). De fato, muitos adolescentes fazem uso de cigarros e/ou de álcool e acabam se tornando fumantes crônicos e/ou alcoólicos na fase adulta de suas vidas. Certamente, existe uma grande probabilidade de evoluir do consumo esporádico para o uso abusivo dessas drogas podendo levar a uma dependência que está

associada com o início precoce do seu uso (Anthony e Petronis, 1995; Robins, 1985).

2 – TABACO vs. NICOTINA

2.1 – Aspectos Gerais

Quando Colombo aportou nas Américas, plantava-se tabaco em todo o continente. O primeiro contato do mundo civilizado com a nicotina ocorreu no século XVI quando a planta e sementes de tabaco foram levadas para Europa pela tripulação de Colombo e por lá foram amplamente difundidas. O tabaco é uma substância estimulante que pode ser encontrado em forma de charuto, cigarro, cachimbo, rapé e tabaco de mascar. O tabaco é principalmente fumado e sua combustão produz inúmeras substâncias como gases e vapores, que passam para os pulmões através do fumo (Rosenberg, 2004).

As conseqüências do uso do tabaco incluem efeitos destrutivos em vários tecidos, produzindo desde doenças pulmonares simples até alterações celulares que predis põem ao câncer e alterações cardíacas, vasculares e cerebrais (Gilbert, 1989; Meliska e Gilbert, 1991). A queima do cigarro também libera nicotina, a substância responsável pela dependência do tabaco, uma amina terciária volátil capaz de estimular e/ou deprimir o sistema nervoso central e todo o organismo, dependendo da dose e da freqüência com que é utilizada (Henningfield e Keenan, 1993). O nome “nicotina” deriva de Nicot, embaixador da França em Portugal por volta de 1560, e em 1737 Linneu classificou diversas plantas do tabaco (p.ex.: *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana rústica*), sendo as mais difundidas: a *Nicotiana tabacum* mais suave e de aroma delicado, e a *Nicotiana rústica* de paladar mais forte, usada em algumas regiões e por mais tempo na Rússia (Brooks, 1953; Vigié, 1980).

A nicotina foi sintetizada em laboratório pela primeira vez em 1904, mas desde 1690, na França, ela já era conhecida e usada como inseticida na agricultura. Ela é a mola mestra da universalização do tabaco. Com o uso dos derivados do tabaco inicia-se o hábito de fumar e, aos 19 anos de idade, mais de 90% dos usuários já estão dependentes da nicotina. Por isso, o tabagismo é

considerado uma doença pediátrica provocada pela nicotina (Taioli e Wynder, 1991).

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável em todo o mundo e o total de mortes devido ao uso do tabaco atingiu a cifra de 4,9 milhões de mortes por ano, o que corresponde a mais de 10 mil mortes por dia (WHO, 2003). No Brasil, cerca de 20% da população adulta é fumante e entre a população mais jovem, cerca de três milhões são fumantes sendo que, 370 mil deles têm idades que variam de 10 a 14 anos (INCA, 2004). Apesar desses achados, poucos fumantes conhecem a legislação brasileira que proíbe vender, fornecer ou entregar, à criança ou ao adolescente, produtos cujos componentes possam causar dependência física ou psíquica e a impressão da frase nas embalagens dos produtos derivados do tabaco: “Venda proibida a menores de 18 anos” (Lei n.º 10.702, 2003, Lei n.º 8.069, 1990).

O uso freqüente de tabaco leva ao desenvolvimento de tolerância e dependência. Dependência de qualquer droga é diagnosticada por determinados critérios, que muitas vezes não são fáceis de definir em modelos animais. Estes critérios incluem o consumo dessa droga aumentando progressivamente, a continuidade da utilização excessiva apesar dos efeitos adversos da droga, e a produção de uma síndrome de abstinência fisiológica (Little et al., 1996).

Como outras dependências, a da nicotina é um transtorno progressivo, crônico e recorrente, mediada pela ação de determinadas substâncias em receptores centrais. O processo da dependência envolve vários fatores: ambientais, biológicos e psicológicos. Fatores não-farmacológicos são importantes para a determinação dos problemas relacionados ao uso de tabaco e sua prevalência, mas os fatores farmacológicos são aqueles que definem a tolerância e a dependência pela substância (Boyle, 1997; Henningfield et al., 1996).

Embora o uso do primeiro cigarro seja tipicamente marcado por efeitos desagradáveis, como dor de cabeça, tonturas, nervosismo, insônia, tosse e náusea, esses efeitos diminuem rapidamente. Isto possibilita novas tentativas até que se desenvolva tolerância à droga, estabelecendo um padrão típico de consumo diário (Perkins, 1992). No caso da nicotina, os efeitos estimulantes são qualitativamente semelhantes aos da cocaína e da anfetamina, mas os fumantes

também procuram na nicotina o alívio da ansiedade e a diminuição da reatividade a estímulos que causam irritação (Henningfield et al., 1991). A nicotina promove ainda um rápido, mas pequeno aumento do estado de alerta, melhorando a atenção, a concentração e a memória em animais adultos, além disso, diminui o apetite (Haxby, 1995).

Esses efeitos, em contraposição aos sintomas desagradáveis da falta da substância no cérebro, podem contribuir para a dificuldade na manutenção da abstinência (American Psychiatric Association, 1996). A sensação de relaxamento e calma descrita pela maioria dos usuários tem sido atribuída à inibição de sintomas desagradáveis da síndrome de abstinência em vários estudos.

Começar a fumar durante a adolescência está associado à dependência química que se estende por longos períodos (Chen e Millar, 1998; Pierce e Gilpin, 1996) e talvez mais importante, parte dos fumantes adolescentes apresentam sintomas de dependência a nicotina somente com poucos dias de fumo ocasional (DiFranza et al., 2000; O'Loughlin et al., 2002). Estes achados sugerem que o cérebro do adolescente é particularmente susceptível à nicotina. Entre os fumantes que já tentaram parar de usar o tabaco, cinco a sete tentativas são necessárias, pois, a síndrome de abstinência instala-se caso o consumo seja reduzido em pelo menos 50% (West et al., 1989). Em seres humanos, a síndrome de abstinência inicia-se em torno de oito horas após o último cigarro, atinge o auge no terceiro dia e inclui *craving* ou “fissura”, ansiedade, irritabilidade, sonolência diurna e insônia, apetite aumentado para doces, batimentos cardíacos e pressão arterial diminuídos (Dupont e Gold, 1995). Parece que quanto maior o consumo, maior a gravidade da síndrome de abstinência. Os sintomas e a magnitude da síndrome de abstinência podem persistir por meses e, dependendo de sua gravidade, são pouco tolerados. Em função desse desconforto, é difícil para os usuários manter a abstinência (Hughes, et al., 1990; Stoleran, 1999)

2.2 – Aspectos Farmacológicos

Nas últimas décadas, a partir de diversos estudos sobre o metabolismo da nicotina, foi demonstrado que as concentrações dessa substância no sangue de tabagistas revelam sua rápida elevação após a tragada, atingindo o pico máximo em cerca de 7 minutos. A rápida taxa de absorção e as grandes quantidades de

nicotina que chegam ao cérebro pelo tabagismo são dois fatores importantes na promoção e manutenção do vício (Benowitz et al., 1998).

O conteúdo de nicotina varia de 7-9 mg por cada cigarro fumado, dos quais se estima que a absorção pelo organismo varie de 0,1-1,0 mg pelo fumante. A nicotina é rapidamente absorvida pelos pulmões, atingindo o cérebro em dez segundos e sendo distribuída para todos os sistemas (Benowitz, 1992, www.souzacruz.com.br, 2009). A meia-vida de eliminação da nicotina é de aproximadamente duas horas no homem. Sua metabolização ocorre principalmente no fígado e apenas 5% da nicotina são excretadas em sua forma original pelos rins (US Department of Health and Human Services, 1988). Somando-se os valores das meias-vidas do consumo de tabaco subsequentes, pode-se prever que a nicotina se acumula, num fumante regular, a níveis significantes sanguíneos por pelo menos 6-8 horas depois de cessado de fumar (Hukkanen et al., 2005). Seu metabólito principal é a cotinina, cuja detecção pode ser utilizada como um coadjuvante no tratamento da dependência de nicotina, monitorando a abstinência. Nicotina e cotinina podem ser detectadas na urina, no sangue e na saliva (material orgânico de mais fácil utilização na rotina (Armitage, 1965, Benowitz, 1999). Em humanos cerca de 70 a 80% da nicotina é convertida em cotinina (Hukkanen et al., 2005). A cotinina, por possuir uma meia-vida plasmática mais longa, tem sido utilizada como marcador da exposição ao tabagismo. A isoenzima CYP2A6 do citocromo P450 tem sido demonstrada como a enzima que é primariamente responsável pelo metabolismo da nicotina em humanos. Diversos polimorfismos foram descritos para essa enzima (Hukkanen et al., 2005; Oscarson, 2001).

Os principais efeitos da nicotina são mediados por receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (Dani e De Biasi, 2001; Wonnacott et al., 2005). Os nAChRs são receptores ionotrópicos pentaméricos e estão localizados em sítios pré e pós sinápticos no sistema nervoso central e periférico (Clarke, 1985; Sargent, 1993). Os receptores nicotínicos periféricos estão em gânglios autonômicos, na supra-renal, nos nervos sensitivos e na musculatura esquelética (Sargent, 1993). No desenvolvimento cerebral, nAChRs são detectados desde o início do desenvolvimento embrionário em humanos e outros animais (Adams et al., 2002; Hellstrom-Lindahl et al., 1998; Naeff et al., 1992; Tribollet et al., 2004).

Existe uma grande variedade de subtipos nAChRs que surge das possibilidades de combinações de cada uma das suas subunidades. Em mamíferos, já foram clonadas 8 subunidades α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$, $\alpha 9$ e $\alpha 10$) e 3 subunidades β ($\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$) (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001; Lindstrom et al., 1996; McGehee e Role, 1995; Sargent, 1993; Tassonyi et al., 2002). A diversidade dos subtipos de nAChRs, sua localização (pré e pós sináptica) e sua distribuição cerebral contribuem para os diversos mecanismos que estes receptores participam no sistema nervoso central. A ativação dos receptores pré-sinápticos de modo geral promove a liberação de outros neurotransmissores, enquanto que, a ativação de receptores pós sinápticos promove excitação neuronal, como também, a modulação da atividade enzimática (Aramakis e Metherate, 1998; Dani et al., 2000).

A modulação na liberação de neurotransmissores faz com que os nAChRs desempenhem um papel importante em muitos processos fisiológicos e patológicos incluindo o desenvolvimento neuronal, aprendizado e memória e respostas de reforço induzidas por drogas de abuso (Gopalakrishnan et al., 1997; Jang et al., 2002b; Levin e Simon, 1998; Salamone et al., 1999). Há evidências de que nAChRs também estão envolvidos em processos como ansiedade (File et al., 2000; Ross et al., 2000), controle do sono (Domino e Yamamoto, 1965; Salin-Pascual et al., 1999), antinocicepção (Marubio et al., 1999) e funções do sistema nervoso autônomo (DeBiasi M., 2002; Xu et al., 1999^a; Xu et al., 1999^b). Adicionalmente, nAChRs podem estar envolvidos em transtornos neurológicos como epilepsia noturna, esquizofrenia, Parkinsonismo e Alzheimer (Dani e De Biasi, 2001; Levin e Simon, 1998; Moulard et al., 2001; Rusted et al., 2000).

Variações na expressão de subtipos particulares de nAChR podem explicar diferentes ações da nicotina em diferentes regiões cerebrais e em determinados tecidos. Dependendo do subtipo de receptor expressado, a nicotina pode exercer um efeito neuroprotetor ou ocasionar ações neurotóxicas (Broide et al., 1996; Laudenbach et al., 2002; Zoli et al., 1995).

A nicotina pode regular a liberação de uma grande variedade de neurotransmissores (Wonnacott, 1997) podendo afetar o padrão de funcionamento de vários outros sistemas além do sistema colinérgico. O sistema dopaminérgico é um dos mais afetados pela estimulação dos nAChR pela nicotina. Neste sentido, é muito bem conhecido que a nicotina induz a liberação

de dopamina em todas as grandes vias dopaminérgicas, incluindo a via nigroestriatal e a via mesolímbica. Particularmente, a via mesolímbica tem sido o foco de estudos sobre os efeitos de reforço e recompensa, fundamentais na geração do vício pela nicotina, como também, por outras drogas de abuso (Leshner, 1996; Nisell et al., 1995). Esta via tem origem na área do tegumento ventral do mesencéfalo e projeta para o núcleo acumbente, sistema límbico e córtex orbitofrontal. Além do sistema dopaminérgico, também tem sido descritas alterações nos sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos e GABAérgicos (Slotkin e Seidler, 2009; Xiao et al., 2009).

2.3 – Alterações morfológicas

Diversos estudos divulgam amplamente que o hábito de fumar durante a gestação tem efeitos adversos no período fetal, aumentando a morbidade e mortalidade perinatal e evocando danos neurocomportamentais a longo prazo (DiFranza e Lew, 1995; Slotkin, TA. 1998). A prole de fumantes apresenta déficits cognitivos e de atenção, prejudicando o aprendizado e a memória, baixando o QI, e aumentando as desordens de conduta (Naeye e Peters, 1984; Rantakallio e Koironen, 1987; Wakschlag et al., 1997).

Esses efeitos podem ser duradouros e podem trazer conseqüências prejudiciais ao sistema nervoso durante vários estágios do crescimento e do desenvolvimento, mais notavelmente durante a adolescência. Algumas das alterações patológicas observadas em ratos adolescentes e adultos previamente expostos a nicotina, são caracterizadas por um aumento significativo de morte neuronal e por uma diminuição significativa na densidade de neurônios sobreviventes na região CA1 do hipocampo (Abdel-Rahman et al., 2003).

Estudos anteriores indicam que a exposição à nicotina causa alterações persistentes em biomarcadores associados a danos neuronais em animais adolecentes, mas não em adultos (Abreu-Villaça et al., 2003b, Abreu-Villaça et al., 2004^a; Trauth et al., 2000a), assim como morte neuronal e mudanças no tamanho celular no hipocampo (Jang et al., 2002^a; Slotkin, 2002). De fato, os efeitos do uso de nicotina pelos adolescentes diferem não apenas dos adultos como também dos efeitos observados após a exposição fetal indicando que a adolescência representa um período único de vulnerabilidade.

Algumas alterações morfológicas detectadas no cérebro adolescente podem ser ocasionadas por alterações sofridas pela exposição à nicotina no período pré ou no período perinatal. Estudos recentes mostraram uma diminuição no número de células de Purkinje no cerebelo da prole de ratos de ambos os sexos (Abdel-Rahman et al., 2003) e déficits no número de células e macromoléculas no hipocampo e no cerebelo de ratos expostos à nicotina no período fetal (Slotkin et al., 1987).

Estudos *in vitro* indicam que a nicotina provoca apoptose em culturas de células progenitoras hipocampais (Berger et al., 1998) e estudos *in vivo* indicam que a nicotina promove déficits na função colinérgica hipocampal observáveis no EEG e em testes comportamentais, sendo esses alguns dos muitos efeitos que emergem primeiramente no período após o desmame (Levin et al., 1996; Slawecki et al., 2000; Yanai et al., 1992; Zahalka et al., 1992).

Estudos com embriões expostos à nicotina *in vitro* mostraram que a exposição à nicotina provoca uma alteração no neuroepitélio de células do hipocampo e aumento da morte celular por apoptose evidenciando uma susceptibilidade específica do desenvolvimento hipocampal aos insultos da nicotina (Joschko et al., 1991).

Quanto à exposição durante a adolescência, foi demonstrado que ratos tratados com nicotina apresentaram um aumento cerca de 120% no número de células positivas para TUNEL na camada de células granulosa e no hilo do giro denteado do hipocampo demonstrando um grande índice de apoptose ocorrendo nessa região (Jang et al., 2002a). Outro estudo, ainda em ratos adolescentes, demonstrou um aumento significativo no tamanho do dendrito basilar de células piramidais do hipocampo com tufo apicais elaborados, mas não em células com tufo apicais pequenos. Estes resultados foram diferentes dos observados em ratos adultos, onde houve um aumento do tamanho do dendrito basilar e no número de feixes em células piramidais com tufo apicais pequenos, mas não em células piramidais com tufo dendríticos complexos (Bergstrom et al., 2008).

3 – ETANOL

3.1 – Aspectos Gerais

Acredita-se que a bebida alcoólica teve sua origem na Pré-História, mais precisamente durante o período Neolítico quando houve a aparição da agricultura e a invenção da cerâmica. A partir de um processo de fermentação natural ocorrido há aproximadamente 10.000 anos o ser humano passou a consumir e a atribuir diferentes significados ao uso do álcool. Os egípcios acreditavam que as bebidas fermentadas eliminavam os germes e parasitas e deveriam ser usadas como medicamentos, especialmente na luta contra algumas parasitoses provenientes das águas do rio Nilo (Viala-Artigues e Mechetti, 2003).

No século X, Avicena - médico, astrônomo e filósofo árabe - descobriu o processo de destilação do material fermentado, mas os primeiros registros do processo de destilação foram dos gregos, que descrevem o processo de obtenção da *ácqua ardens* (água que pega fogo - água ardente) quando Plínio, o velho (23-79 d.C.), escreveu em seu "Tratado da ciência" que apanhando o vapor da resina de cedro, do bico de uma chaleira, com um pedaço de lã e torcendo esse tecido obtém-se o "Al kuhu". A partir do século XII, os alquimistas europeus classificaram o produto da destilação como "aqua ardens" literalmente água que pegava fogo, e atribuem a ela propriedades místico-medicinais. A destilação produz um líquido composto em sua maior parte por álcool etílico. Pela força da expansão do Império Romano, a tecnologia de produção das bebidas destiladas espalha-se pelo velho e novo mundo (Viala-Artigues e Mechetti, 2003).

O fim do século XVIII e o início da Revolução Industrial são acompanhados de mudanças demográficas e de comportamentos sociais na Europa. É durante este período que o uso excessivo de bebida passa a ser visto por alguns como uma doença ou desordem. No século XIX, alguns estudiosos passam a tecer considerações sobre as diferenças entre as bebidas destiladas e as bebidas fermentadas, em especial o vinho. Neste sentido, Pasteur em 1865, não encontrando germes maléficos no vinho declara que esta é a mais higiênica das bebidas (Jerome, 1993).

No início do século XX, tanto na Europa quanto na América, algumas medidas foram tomadas para evitar o consumo excessivo de bebidas alcoólicas: na França passam a estabelecer a maioridade de 18 anos para o consumo de

álcool e nos EUA, foi decretada a Lei Seca que teve duração de quase 12 anos (Jerome, 1993).

Assim como o tabaco, a experimentação do álcool etílico ou etanol é muito comum entre adolescentes humanos. Alguns estudos recentes mostram que o consumo precoce de álcool predispõe à posterior dependência ao mesmo (Grant, 1998b). Alterações induzidas pelo etanol no cérebro do adolescente são diferentes das observadas em cérebro de adultos. Essa hipótese é suportada por estudos que comprovam que os adolescentes exibem danos mais severos causados pelo uso de etanol, observados em regiões como o córtex frontal, diferentemente dos adultos (Crews et al., 2000), e essas alterações estendem-se às funções cognitivas (Osboran e Butler, 1983).

Os adolescentes constituem um grupo de risco peculiar entre os consumidores de bebidas alcoólicas em dois aspectos principais: a época de início do seu consumo e a forma como bebem. A precocidade de início do uso de álcool é um dos fatores preditores mais relevantes de problemas futuros. O consumo antes dos 16 anos aumenta significativamente o risco para beber pesado na idade adulta, em ambos os sexos (Laranjeira e Hinkly, 2002, Romano et al., 2007). Pesquisas indicam que quanto menor a idade mínima legal para o consumo de bebidas, maiores as possibilidades de ocorrência de acidentes de trânsito relacionados ao álcool, de traumatismos acidentais, homicídios, suicídios e acidentes com armas de fogo (Brewer e Swahn, 2005, Jones et al., 1992). Quanto à forma de beber, estudos apontam que 90% do álcool consumido por adolescentes nos Estados Unidos ocorrem de forma abusiva (*binge drinking*), ou seja, a ingestão de cinco ou mais doses na mesma ocasião, para homens, ou quatro ou mais doses para mulheres (Brewer e Swahn, 2005). Este padrão de consumo expõe o organismo jovem a doses tóxicas de álcool, predispondo-o a uma série de comportamentos de riscos que resultam em gravidez indesejada, doenças sexualmente transmissíveis e acidentes automobilísticos (Room et al., 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 1998) propõe duas políticas de alta evidência de efetividade para diminuir os problemas relacionados ao consumo do álcool em adolescentes: o aumento do preço da bebida e a implementação e fiscalização da idade mínima para se beber (Caetano, 2003; Komro e Toomey, 2002). Na realidade, a disponibilidade comercial também desempenha papel

relevante e vêm sendo conduzidas pesquisas em vários países para verificar com que facilidade os adolescentes obtêm bebidas alcoólicas em pontos de venda (Forster et al., 1995; Freisthler et al., 2003; Komro e Toomey, 2002; Wolfson et al., 1996) e de que forma a sua compra é realizada: diretamente, por meio de irmãos, amigos ou adquirindo as bebidas em casa (Wagenaar et al., 1993; Wagenaar et al., 1996).

O alcoolismo entre os adolescentes é um problema de saúde e segurança pública do Brasil: um estudo realizado em 2004 com 48 mil estudantes do ensino público fundamental e médio mostrou que 44,3% haviam feito uso de álcool nos 30 dias que antecederam a pesquisa e 11,7% dos adolescentes pesquisados relataram uso de seis ou mais vezes no mês (Galduróz et al., 2004).

Ao mesmo tempo em que a lei brasileira define como proibida a venda de bebidas alcoólicas para menores de 18 anos (Lei nº 9.294 e artigo 63 da Lei das Contravenções Penais, 1996), é prática comum o consumo de álcool pelos jovens – seja no ambiente domiciliar, em festividades, ou mesmo em ambientes públicos. A sociedade como um todo adota atitudes paradoxais frente ao tema: por um lado, condena o abuso de álcool pelos jovens, mas é tipicamente permissiva ao estímulo do consumo por meio da propaganda (Pechansky et al., 2004). Um estudo feito sobre comerciais de televisão envolvendo bebidas alcoólicas demonstrou que a frequência destes comerciais era, em média, maior do que a frequência de comerciais sobre outros produtos, como bebidas não alcoólicas, medicamentos ou cigarros. Além disso, dos cinco temas mais frequentemente encontrados nos comerciais de bebidas alcoólicas, três deles (como relaxamento, camaradagem e humor) eram diretamente relacionáveis às expectativas dos jovens (Pinsky e Silva, 1999).

Atualmente, existe um movimento na direção do consumo responsável de álcool, como indica, por exemplo, o website da Companhia Brasileira de Bebidas – AMBEV (www.ambev.com.br, 2009), com campanhas na mídia associando o consumo de álcool com moderação ou com prevenção de acidentes, ou mesmo de iniciativas do Conselho Nacional de Auto-Regulamentação Publicitária (CONAR) quanto à regulamentação de propaganda voltada para jovens. Em resolução divulgada em outubro de 2003, o CONAR define uma série de regras e parâmetros restritivos à propaganda de bebidas alcoólicas visando à exclusão de imagens voltadas para menores, vetando a utilização de pessoas de menos de 25

anos nos comerciais, dentre outras. Mesmo assim, das mensagens que o CONAR resolve que deverão fazer parte obrigatória das cláusulas de advertência nos comerciais, apenas uma é explicitamente voltada a informar que o consumo não se destina a crianças ou adolescentes (“ESTE PRODUTO É DESTINADO A ADULTOS”). As demais fazem menção a restringir o abuso, não beber e dirigir, e beber com moderação (CONAR, 2003).

Com relação ao controle do consumo de bebidas alcoólicas, estudos recentes, realizados nos EUA, confirmam a impressão leiga de que a maioria dos estabelecimentos comerciais vende bebidas alcoólicas para indivíduos menores de 21 anos sem solicitação de verificação da idade (Toomey e Wagenaar, 2002; Wagenaar et al., 1993). Outro dado preocupante é o de que, apesar de o controle ser maior sobre o consumo de álcool dentro de ambientes com grande concentração de jovens (escolas e universidades, por exemplo), existe a entrega domiciliar de bebidas alcoólicas vendidas por telefone favorecendo o menor controle sobre o consumo de álcool por menores de idade (Pechansky et al., 2004).

Ao analisar mitos culturais e símbolos utilizados em propaganda sobre álcool, conclui-se que a mídia efetivamente influencia o consumo. Para uma mente em desenvolvimento, tipicamente sugestionável e plástica como a de um adolescente, o paradoxo de posição da sociedade e a falta de firmeza no cumprimento de leis são um caldo de cultura ideal para a experimentação tanto de drogas ilícitas como de álcool, contribuindo para a precocidade da exposição de jovens ao consumo abusivo (Saffer, 1996).

A interrupção do uso de álcool é a única medida eficaz para prevenir ou limitar, efeitos negativos do consumo de bebidas alcoólicas (De Biase e Salas, 2008; WHO, 2004). A maioria dos alcoolistas reconhece os efeitos negativos do abuso dessa droga no organismo e declaram ter vontade de parar de beber, se possível. Entretanto, apesar de muitas tentativas, poucos tem êxito (Gulliver et al., 2006). O maior obstáculo para a abstinência por longos períodos é a presença dos sintomas da retirada da droga. A duração e a severidade da abstinência são fortes preditores da recaída ao uso da droga (Piasecki et al., 2003; West et al., 1989).

3.2 – Aspectos Farmacológicos

O etanol, cuja fórmula molecular é $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, é um líquido incolor com peso molecular 46,07, tem sido descrito como um dos mais peculiares compostos orgânicos contendo oxigênio, dado sua combinação de propriedades como solvente, germicida, anti-congelante, combustível, componente de bebidas, além de grande versatilidade como intermediário químico para outros produtos (KIRK, 1980).

A intoxicação e o envenenamento por etanol são provocados quase que invariavelmente pela sua ingestão como bebida. Assim, uma pessoa de 70Kg deverá ser intoxicada por uma ingestão de etanol de 75 a 80g, sofrerá entorpecimento com 150 a 200g e poderá morrer com 250 a 500g. Existe alguma controvérsia sobre o fato de ser possível ou não a embriaguez resultante de inalação de vapores do etanol (Ridker et al., 1994).

Ao contrário da nicotina, não há um receptor específico para o etanol. Inversamente, o etanol tem sua ação inicial numa variedade de alvos nas membranas celulares e sinais intracelulares de transdução, induzindo efeitos em receptores de neurotransmissores e canais iônicos voltagem-dependentes (Koob et al., 1998). Desta forma, o etanol exerce seu efeito através de interações dose-dependentes com diversos sistemas neurais, incluindo GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e sistemas opióides (Eckardt et al., 1998). Muitos desses sistemas neurais ainda estão em maturação durante a adolescência. Assim, pode-se supor que o cérebro do adolescente ainda é vulnerável aos efeitos deletérios da exposição a agentes externos; entre estes o etanol. Os receptores glutamatérgicos e GABAérgicos estão entre os mais importantes sítios de ligação para os efeitos comportamentais do etanol (Eckardt et al., 1998).

Ao longo dos últimos dez anos, estudos têm comprovado que o glutamato está envolvido com o desenvolvimento neural, a plasticidade sináptica, o aprendizado, a memória, danos neuronais, doenças neurodegenerativas, e à dependência e tolerância às drogas (Meldrum, 2000). A inibição da via excitatória glutamatérgica pelo etanol, especialmente a do receptor NMDA, pode ser uma importante causa dos efeitos neurotóxicos (Tsai e Coyle, 1998), particularmente

intoxicação, sintomas de abstinência e episódios de perda de memória (Tsai e Coyle, 1998).

Estudos anteriores observaram que a função dos receptores NMDA é afetada pelo etanol de forma dose dependente. Esse receptor será inibido em concentrações que variam de 5-50 mM, níveis que são considerados altos e que pode provocar intoxicação, sendo que a ativação dos receptores NMDA ficou reduzida cerca de 60% numa concentração de 50 mM de álcool no organismo (Allgaier, 2002). Importante para a resposta ao álcool é a subunidade dos receptores alvo. Portanto, nos receptores NMDA, as subunidades NR1/NR2A ou NR1/NR2B são mais sensíveis aos efeitos inibitórios do álcool que as subunidades NR1/NR2C ou NR1/NR2D (Para revisão: Ikonomidou, 2009). Doses de etanol abaixo dessa concentração também interferem na função dos receptores NMDA. Concentrações muito baixas (1,74-8,65 mM) aumentam a probabilidade da abertura do canal iônico após ativação pelo NMDA em cultura de células hipocâmpais, sem afetar o tempo de abertura do canal, enquanto etanol em altas concentrações (86,5-174 mM) promove uma diminuição da probabilidade de abertura do canal, como também reduz o tempo de sua abertura (Lima-Landman e Albuquerque, 1989).

Os nAChRs têm sido reconhecidos como importantes sítios de ação do etanol. Estes receptores estão localizados no corpo celular, regiões pré-terminais e pré-sinápticas GABAérgicas e em outros neurônios em diferentes regiões cerebrais como o córtex e hipocampo. A ativação destes nAChRs têm mostrado aumentar a liberação sináptica de GABA, glutamato, e outros neurotransmissores (Alkondon et al., 1997; Alkondon et al., 2000; Colquhoun e Patrick, 1997; Lindstrom et al., 1996; Role e Berg, 1996; Yang e Buccafusco, 1994). Diversos efeitos comportamentais do etanol que parecem requerer componentes dos receptores GABA_A e receptores dopaminérgicos, incluindo recompensa e reforço (Albuquerque et al., 1997, Blomqvist et al., 1997, Pontieri et al., 1996), podendo estar em parte relacionados com a modulação dos nAChRs que resulta em mudanças comportamentais (Alkondon e Albuquerque, 2001; Alkondon e Albuquerque, 2002; Amtage et al., 2004; Kiyosawa et al., 2001; Li e Eisenach, 2002; O'Leary e Leslie, 2003).

Uma vez que a nicotina tem como alvos primários os nAChRs, esses receptores são locais em que a nicotina e o etanol podem interagir. Corroborando

com esta sugestão, demonstrou-se que o etanol aumenta o fluxo de íons induzido por agonistas colinérgicos (Aistrup et al., 1999; Cardoso et al., 1999) e estimula a liberação da dopamina por diversos sistemas (como o sistema mesolímbico) através da ativação dos receptores nicotínicos (Soderpalm et al., 2000).

3.3 – Alterações morfológicas

O sistema nervoso central (SNC) é altamente sensível às ações neurotóxicas do etanol durante o desenvolvimento. Geralmente, o resultado final da exposição ao etanol durante o desenvolvimento do cérebro é a redução do número de células em várias estruturas cerebrais (Barnes e Walker, 1981; Marcussen et al., 1994). Nem todas as estruturas no desenvolvimento cerebral, entretanto, demonstram perda neuronal depois da exposição ao etanol. Estudos anteriores (Napper e West, 1995; West et al., 1981) demonstraram que a administração do etanol durante o período pós-natal leva a um aumento no número de células no giro denteado e do peso do hipocampo do rato. A razão para este paradoxo no giro denteado não está bem clara. Uma possibilidade é que haja reposição celular devido à capacidade de neurogênese na camada de células granulosas do giro denteado do rato (Altman e Bayer, 1990; Cameron e McKay, 2001). Durante as primeiras semanas após o nascimento, as células da camada granulosa do giro denteado desencadeiam um processo de neurogênese e diferenciação. Em experiências com roedores, os efeitos do etanol, dado durante este período, correspondem àqueles durante o terceiro trimestre da gravidez nos seres humanos. Esse dado levou a hipótese de que, contrastando com outras regiões do cérebro, a administração de etanol direta ou indiretamente no hipocampo leva a um aumento na proliferação neuronal e/ou glial no giro denteado (Gould et al., 2001).

No cérebro de alcoólicos, uma variedade de mudanças neuropatológicas tem sido observada, sugerindo que estas alterações estejam associadas com o desenvolvimento de prejuízos cognitivos relacionados ao álcool tais como amnésia e demência (Duchen e Jacobs, 1997). Os mecanismos precisos dessas mudanças patológicas permanecem obscuros, mas investigações do efeito agudo e crônico do etanol, ao nível molecular, sugerem que os danos celulares no cérebro devem ser resultantes da formação de radicais livres e óxido nítrico,

diminuição de neurotropinas, deficiência tiamínica associada ao álcool e do sistema de transmissores de glutamato (Ikegami et al., 2003).

Perda neuronal associada ao álcool deve envolver apoptose. Sabe-se bem que o etanol induz neurodegeneração por apoptose durante o desenvolvimento do cérebro de ratos e já foi demonstrado um aumento marcante de células positivas para TUNEL (Técnica de imunomarcacão pelo terminal 3'-OH do DNA pela desoxinucleotidil transferase) em hipocampo de camundongos após a administração de etanol (Ikonomidou et al., 2000; Pawlak et al., 2002).

Evrard e colaboradores em 2006, estudando cérebros de ratos machos adolescentes, mostraram que os animais cronicamente tratados com baixas doses de etanol apresentaram diminuição significativa da expressão de receptores de serotonina em neurônios do mesencéfalo, mas não observaram diminuição do número, nem mudanças morfológicas em neurônios serotoninérgicos. Mostraram também que houve um aumento de proteínas fibrilares gliais no hipocampo, no estriado e no córtex pré-frontal além de diminuição de algumas proteínas do citoesqueleto neuronal. A análise morfométrica do filamento intermediário de astrócitos revelou um aumento significativo da sua expressão. O astrócito teve sua área aumentada no hipocampo, no estriado e no córtex pré-frontal. Os corpos celulares estavam aumentados e os processos citoplasmáticos estavam mais espessos e mais tortuosos e ramificados (Evrard et al., 2006).

4 – INTERAÇÕES ENTRE NICOTINA E ETANOL

A nicotina tem sido sempre relatada como sendo o marco inicial para a experimentação de novas substâncias, dentre elas, o etanol. O uso abusivo de etanol e nicotina está fortemente associado em adolescentes humanos (Smith et al., 1999). A maioria dos alcoólicos também é fumante e, talvez mais importante, há uma forte correlação entre a idade do início do consumo de tabaco e a incidência de alcoolismo, sendo que quanto mais jovem o adolescente for quando iniciar o hábito de fumar, maior a frequência de alcoolismo, caracterizando a adolescência como um período de vulnerabilidade (Slotkin, 2002; Spear, 2000).

Com relação ao co-abuso de nicotina e etanol, existe uma correlação positiva entre a quantidade de nicotina usada e o consumo de etanol (Wickholm et

al., 2003), assim como entre o risco de ser um fumante “pesado” e a severidade da dependência ao etanol (Para revisão:(Madden e Heath, 2002). Essas relações não podem ser explicadas apenas baseadas em fatores comportamentais e psicossociais, uma vez que a exposição subcrônica intermitente de nicotina aumenta o consumo voluntário de etanol em humanos e também em ratos (Blomqvist et al., 1996, Ericson et al., 2000; Olausson et al., 2001). Portanto, o consumo aumentado de etanol pode ser uma consequência farmacológica da exposição crônica à nicotina.

A relação entre nicotina e etanol também pode ser demonstrada durante a abstinência. A prevalência de tabagismo em indivíduos em tratamento para transtornos por uso de álcool é de 3 a 4 vezes maior em comparação com o relatado para a população em geral (Batel et al., 1995). É interessante observar que a decisão de deixar de beber está fortemente associada ao sucesso na decisão de parar de fumar (Zimmerman et al., 1990). Além disso, os indivíduos que são ex-alcoólicos são menos bem sucedidos na decisão de parar de fumar do que os indivíduos em geral (Bobo et al., 1987; Dawson, 2000) e diminuições no consumo de cigarro e tabagismo estão associados com melhores resultados no tratamento de alcoolismo (Friend e Pagano, 2004; Friend e Pagano, 2005). Estudos anteriores indicam que uma investigação mais detalhada dos substratos neurobiológicos afetados por essas drogas de abuso são importantes para uma melhor compreensão dos fatores que determinam a co-utilização e a recaída ao consumo de droga.

Apesar destes achados, tem havido relativamente poucos estudos animais com foco na neurobiologia básica da exposição combinada à nicotina e etanol no cérebro. Mais importante, não temos conhecimento de estudos em modelos animais com o objetivo de verificar efeitos da dupla exposição à nicotina e álcool durante a adolescência, o período em que o consumo de tabaco e álcool tem início (Bachtell e Ryabinin, 2001; Penland et al., 2001; Tizabi et al., 2003).

Com o objetivo de preencher algumas lacunas neste tema, em nosso laboratório (Lab de Neurofisiologia/IBRAG/UERJ) estamos realizando estudos com a exposição a estas drogas e já encontramos alterações comportamentais e bioquímicas devidas à exposição isolada e combinada durante a adolescência.

Com relação às alterações comportamentais, utilizando o teste comportamental labirinto em cruz elevado para medição dos níveis de ansiedade

(Abreu-Villaça et al., 2008), demonstramos que o etanol teve um efeito ansiolítico em camundongos adolescentes e que a co-exposição com nicotina reverteu esse efeito. Os efeitos da abstinência de curto prazo são sexo-dependentes: a exposição à nicotina e/ou ao etanol teve um efeito ansiogênico apenas em fêmeas. Entretanto, apesar de nem a nicotina nem o etanol terem seus efeitos persistentes por mais de um mês pós-exposição, a co-exposição provocou uma resposta ansiogênia. Esses resultados sugerem que a resposta deficiente aos efeitos ansiolíticos do etanol nos adolescentes co-expostos a nicotina+etanol pode induzir um consumo mais elevado do etanol. Adicionalmente, o aumento da ansiedade a longo prazo durante a retirada do fumo e da bebida pode facilitar a recaída ao uso dessas drogas (Abreu-Villaça et al., 2008).

Durante a exposição com nicotina e/ou etanol, camundongos foram testados na caixa da esQUIVA passiva para avaliação de aprendizado/memória. Os déficits de memória e aprendizado devidos à exposição concomitante à nicotina e ao etanol refletiram a soma dos déficits causados pela nicotina e etanol isoladamente. Durante a retirada de curto prazo, a nicotina melhorou o aprendizado/memória, entretanto, o etanol bloqueou as melhorias induzidas pela nicotina. Um mês após o término da exposição, apenas em fêmeas houve uma melhoria significativa no aprendizado/memória como resultado da co-administração. Esses resultados sugerem que em detrimento dos efeitos da nicotina e do etanol no aprendizado/memória durante a exposição combinada em adolescentes, os déficits não são persistentes durante a retirada. De fato, a exposição combinada provoca um efeito benéfico tardio sexo-dependente no aprendizado/memória (Abreu-Villaça et al., 2007).

Uma vez que a nicotina é um análogo da acetilcolina, seus alvos primários e mediadores celulares são os receptores nicotínicos (nAChRs), receptores ionotrópicos amplamente distribuídos no sistema nervoso. O álcool por sua vez, tem influência direta na função de vários canais iônicos ativados por neurotransmissores, incluindo os nAChRs (Grant, 1998a), o que sugere que o nAChR é um sítio de interação entre nicotina e álcool. Assim, foi realizado também um estudo das alterações bioquímicas no sistema colinérgico pela avaliação da densidade do receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$, da atividade da colina acetiltransferase (ChAT), a enzima que sintetiza a acetilcolina, e a densidade do receptor pré-sináptico de alta afinidade de colina. A análise do córtex cerebral e

do mesencéfalo de animais expostos na adolescência indicou que nicotina induz maior densidade de receptores no grupo exposto somente à nicotina, efeito este chamado de *upregulation*. No grupo exposto à nicotina e etanol a *upregulation* foi mais intensa. Durante o período de retirada de curto prazo houve manutenção da *upregulation* no grupo previamente exposto à nicotina e no grupo exposto à nicotina combinada com etanol. Um mês após o término da exposição (PN75) todos os grupos foram iguais, devido à reverção da *upregulation*. Esses dados sugerem que as alterações colinérgicas sobre os nAChRs geradas pela co-exposição estão associadas com a exposição prévia a nicotina (Ribeiro-Carvalho et al., 2008 e 2009).

Quanto à análise da atividade da ChAT, a nicotina e o etanol causaram alterações dependentes da região cerebral indicando perda de inervação colinérgica, podendo refletir morte de neurônio (Trauth et al., 2000a). Contudo, a co-exposição com o etanol reverteu o efeito causado pela nicotina tanto no córtex cerebral quanto no mesencéfalo. Após a retirada do tratamento foi observado um aumento da atividade de ChAT tanto para o grupo exposto à nicotina quanto para o grupo exposto à nicotina e etanol sugerindo uma resposta compensatória ao dano celular causado pela exposição à essas drogas. Os efeitos em longo prazo mostraram que o grupo previamente exposto à nicotina+etanol apresentou diminuição da atividade da ChAT podendo estar associada com a perda da inervação colinérgica a longo prazo (Ribeiro-Carvalho et al., 2008 e 2009).

Com relação aos efeitos da exposição de nicotina e/ou etanol no transportador pré-sináptico de colina, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados durante a adolescência. Já no período de retirada, o grupo de animais exposto ao etanol e nicotina+etanol apresentou uma diminuição no transportador de colina, que persistiu pelo menos até um mês após o término da exposição sugerindo que a co-exposição gerou redução da atividade colinérgica, muito provavelmente devido à ação da retirada do etanol (Ribeiro-Carvalho et al., 2008 e 2009).

Dando continuidade ao estudo com dupla-exposição, como parte da análise dos efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência, o presente trabalho está focalizando a análise em alterações morfológicas ao final da exposição e durante o período de retirada. Para tal utilizamos técnicas

morfológicas visando quantificar morte celular programada (apoptose) e densidade numérica de neurônios e células gliais no cérebro de camundongos.

5 – APOPTOSE

O termo "apoptose" foi introduzido em 1972, mas somente no início da década de 90 começou a ser intensamente investigado. "Apoptose" origina-se do grego e significa "cair fora" (Cotran et al, 1996). Ela é definida como o mecanismo pelo qual a célula promove a sua autodestruição de modo programado. Esse fenômeno já foi observado, durante a embriogênese (principalmente nas fases de organogênese e de involução), durante os processos de metamorfose (relacionados principalmente a metaplasias), em quadros de alteração hormonal, como a menopausa (envolvendo as células endometriais), em tumores com fases de regressão ou de intensa proliferação e em algumas doenças como a hepatite viral (Kerr et al., 1987; Thompson, 1999).

A importância desse mecanismo, em primeira instância considerado fisiológico, relaciona-se primeiramente ao controle da densidade populacional de células normais; pode ser interpretado também como o instrumento de deleção de células danificadas por toxinas, radiação ou outros agentes externos (Blatt e Glick, 2001), dentre eles a nicotina e o etanol (vide tópicos "Alterações Morfológicas"). Assim, tão importante como a divisão celular e a migração das células, a morte celular regulada (ou programada) permite que o organismo tenha um importante controle do número celular, do tamanho do tecido e de auto-proteção contra células velhas e danificadas que ameaçam a homeostase (Vaux e Korsmeyer, 1999).

Os eventos celulares que fazem parte da apoptose incluem, inicialmente, a condensação da cromatina nuclear, oriunda da fragmentação do DNA por endonucleases. O mecanismo da ativação dessas endonucleases ainda não está completamente estabelecido, essas características próprias devem ser resultado de um desencadeamento comum, conservado, um programa endógeno para a morte celular programada (Wyllie et al., 1980). Há também diminuição do volume celular, decorrente de ligações interprotéicas no citoplasma. As células em apoptose manifestam receptores para macrófagos, os quais fagocitam essas

células. Todos esses eventos são controlados por genes responsáveis pelo crescimento e diferenciação celular (Kerr et al., 1972).

A maioria das mudanças morfológicas que foram observadas em estudos anteriores é causada por um conjunto de proteases do tipo cisteína que são ativadas especificamente em células apoptóticas. Essas proteases da morte são homólogas umas das outras e fazem parte de uma grande família de proteínas conhecidas como caspases (Alnemri et al., 1996). As caspases são altamente conservadas ao longo da evolução, e podem ser encontradas desde em humanos até em animais mais primitivos como os insetos, nematódios e hidras (Budihardjo et al., 1999; Cikala et al., 1999; Earnshaw, 1999; Halappanavar et al., 1999).

Mais de uma dúzia de caspases foram identificadas em humanos; cerca de um terço dessas podem estar envolvidas nos mecanismos de apoptose (Halappanavar et al., 1999; Thornberry et al., 1997). Sabe-se que as caspases possuem um sítio ativo de cisteína e que cliva os seus substratos em bandas Asp-Xxx (posteriormente transformam-se em resíduos de ácido aspártico); um substrato distinto das caspases cuja especificidade é determinada por quatro resíduos amino-terminal para a clivagem (Thornberry et al., 1997).

Essas caspases podem ser subdivididas em famílias baseadas na preferência de substratos e na extensão das seqüências identificadas e estruturas similares. Devido ao fato das caspases produzirem a maioria das mudanças que caracterizam a morte celular por apoptose, essas proteínas podem ser as executoras centrais da via apoptótica. Sendo assim, eliminar a atividade das caspases, através de mutações ou pelo uso de inibidores farmacológicos, diminui ou previne a apoptose (Earnshaw et al., 1999).

6 – ESTEREOLOGIA

Em 1848, o geólogo francês Delesse, interessado em determinar a proporção de determinados minérios contidos em rochas, criou um sistema de linhas paralelas, de comprimento total conhecido (Ct) que, aplicado sobre a superfície de corte de uma determinada rocha, permitia a medida do comprimento parcial dessas linhas que caía sobre um determinado componente que se desejava quantificar (Cp). Portanto, a proporção do elemento em estudo na rocha (Pe) podia ser determinada pela fórmula: $Pe = Cp / Ct \cdot 100 \%$. Demonstrou ainda

que o volume parcial ocupado pelo elemento na rocha (V_v) era numericamente igual à área ocupada por esse elemento na superfície de corte da mesma (S_s) e que por sua vez era numericamente igual à fração do sistema de linhas que caiam sobre o elemento em estudo (P_e). Portanto: $V_v = S_s = P_e$. Ressaltou também que, para aplicação desse método, os corpos em estudo deviam ser isotrópicos, ou seja, os diversos elementos que o compõem deviam estar distribuídos ao acaso e homogeneamente no espaço (Delesse, 1848).

Atualmente são utilizadas "grades" estereológicas, ou sistemas-teste, que facilitam o emprego dessa metodologia. As grades são figuras, geralmente retangulares, de área conhecida, contendo em seu interior um número predeterminado de pontos e segmentos de retas ou de arcos ciclóides, que podem ser sobrepostas às estruturas analisadas para a contagem de pontos e interseções das linhas que caem sobre o elemento em estudo. A escolha da grade vai depender da experiência do pesquisador com seu uso ou do tipo de análise que se deseja realizar (Mandarim-de-Lacerda, 1995).

Na área da biomedicina, existem maneiras diferentes para estimar o número de partículas. A estereologia é mais indicada para esse tipo de estudo porque primeiro, identifica partículas por critérios apropriados e então conta-se essas partículas. No passado, a contagem em 3D de imagens seccional de partículas era baseada apenas em suposições. Células e seus núcleos eram padronizadas como esferas; sinapses como discos circulares e mitocôndrias como cilindros circulares. Embora confundidos pela inadequação da amostra, esse método baseado em padrões era utilizado até antes de 1980 (Cruz Orive, 1980), o melhor método da época. Os cientistas da época reconheciam que a probabilidade de partículas serem cortadas uma única vez dependia de vários fatores, que incluíam espessura do corte, ângulo do corte, tamanho da partícula e formato da partícula. Essas considerações eram importantes porque um conjunto de perfis celulares 2D não fornecia uma indicação válida do número de células em 3D (Mandarim-de-Lacerda, 1995).

Para quantificar mudanças em número de partículas nos tecidos, esses tecidos precisam ser seccionados. A maneira mais simples e direta para contagem de células é fixar o tecido de interesse, preparar cortes desse tecido, corar os cortes e contar as células sob um microscópio (Gardella et al., 2003).

Mudanças no número de neurônios são essenciais para combinar o número neuronal com o tamanho dos seus alvos e a função característica dos circuitos neuronais (Clarke e Oppenheim, 1995; Oppenheim, 1991). Estudos quantitativos das células nervosas, envolvendo informações sobre número e tamanho de neurônios e sinapses são valiosos para o entendimento de mudanças patológicas, experimentais e de desenvolvimento (Bedi e Warren, 1983; Behse, 1990; Brown et al., 1976; Jacobs e Love, 1985; Jakobsen, 1976; Pollock et al., 1984; Schmalbruch, 1986). Entretanto, a maioria das técnicas anteriores para estimar número, tamanho e distribuição de axônios e neurônios era muito demorada ou apresentavam vieses. Com as técnicas estereológicas agora é possível obter estimativas precisas e sem viés para número e tamanho dessas estruturas de uma pequena amostra de neurônios.

7 – HIPOCAMPO

Acima do tronco encefálico e escondido sob o córtex cerebral, há um conjunto de estruturas primitivas do cérebro denominado sistema límbico. As estruturas do sistema límbico (amígdala, hipocampo e nucleus accumbens, entre outras) estão envolvidas em muitos processos emocionais, particularmente aqueles relacionados à sobrevivência como medo, raiva, dor, prazer, docilidade, afeição e emoções relacionadas ao comportamento sexual. Além dessas funções, duas estruturas do sistema límbico, denominadas amígdala e hipocampo também estão envolvidas nos processos de aprendizado e memória (Marchetti et al., 2002).

O hipocampo é uma elevação curvada de substância cinzenta localizada em toda extensão do assoalho do corno do ventrículo lateral, no lobo temporal. Seu nome se deve à sua semelhança com o formato de um cavalo-marinho (“hippo” = cavalo). O hipocampo, assim como outras partes do sistema límbico, troca sinais constantemente com todo córtex cerebral. Tem sido demonstrado que o hipocampo é uma estrutura importante para a consolidação da memória recente, enquanto o armazenamento da memória de longo prazo está relacionado ao córtex cerebral. O mecanismo exato de formação e retenção de memórias ainda não está totalmente elucidado, mas o potencial de longa duração (LTP – *long term potentiation*) é um dos mecanismos mais comumente estudado em

mamíferos e está diretamente relacionado com a formação e/ou recuperação de diversas formas de memórias (Dale et al., 2001).

O hipocampo, o subiculum e o giro denteado constituem a formação hipocampal. O giro denteado é a estrutura mais proeminente da formação hipocampal, é formado por substância cinzenta e localizado logo abaixo do giro hipocampal, sendo composto por três camadas: a camada molecular, que é contínua ao hipocampo propriamente dito através da fissura hipocampal; a camada granulosa, que é formada por neurônios do tipo oval ou esféricos, densamente compactados, chamados de células granulosas, cujos axônios passam através da camada polimórfica terminando nos dendritos das células piramidais no hipocampo (Jack Jr. et al., 1990).

O hipocampo e o giro denteado orientam-se para cima quando atingem a superfície medial do úncus, formando o terço posterior das superfícies medial e superomedial do úncus. Esta é interposta entre o giro intralímbico, que forma o pólo posterior do úncus e corresponde à região CA3 do hipocampo, e o giro uncinado, que corresponde a uma parte da região CA1, sendo a região CA2 um pequeno campo de células localizadas entre as regiões CA1 e CA3 (Marchetti et al., 2002). As células principais do hipocampo são chamadas de células piramidais devido ao seu formato.

Nos seres humanos, imagens da função hipocampal mostraram que durante certos tipos de tarefas de memória, algumas regiões hipocampais são ativadas e que danos hipocampais resultam em uma incapacidade na formação de memórias recentes. Neste sentido, dano cerebral na região CA1 do hipocampo foi descrito em pacientes com incapacidade de formar novas memórias. Em roedores, potenciais de ação de alguns neurônios hipocampais disparam somente quando o animal está em locais conhecidos. Esses neurônios parecem codificar certos tipos de memórias espaciais, uma vez que, danos no hipocampo de ratos em desenvolvimento provocam inabilidade em realizar este tipo de tarefa.

Apenas há alguns anos atrás, acreditava-se que a neurogênese ocorria apenas no desenvolvimento cerebral e não que ela continuava durante toda a vida. Porém, estudos recentes concluíram que a neurogênese ocorre, em diferentes espécies, continuamente durante toda a vida, inclusive na idade adulta, principalmente em duas regiões cerebrais: (1) a zona subventricular e (2) a zona subgranular (ZSG), região esta que faz parte do giro dentado, de onde as células

recém formadas migram para dentro da camada granulosa e diferenciam-se tanto em células gliais quanto em neurônios que enviam seus axônios para fora dessa camada em direção às fibras de Moss seguindo para a região CA3 e os dendritos seguindo para dentro da camada molecular (Doetsch et al., 1999; Thornberry et al., 1997; Van Praag et al., 1999).

Talvez por ser uma estrutura que mantém considerável plasticidade em períodos tardios do desenvolvimento, como a adolescência (Bayer et al., 1982; McWilliams e Lynch, 1983), o hipocampo é sabidamente afetado por neurotoxinas entre elas a nicotina e o etanol (Gulick e Gould, 2008; Milotova et al., 2008; Oliveira-da-Silva et al., 2009; Robles e Sabriá, 2008). Desta forma, neste estudo, focamos a análise morfológica nesta estrutura cerebral.

8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muito se tem estudado sobre os malefícios causados pelo uso e abuso de nicotina e etanol durante a gravidez e após o desmame, bem como os malefícios do uso dessas drogas no cérebro do indivíduo adulto. Porém pouco se sabe a respeito dos danos ocasionados pelo uso e abuso dessas drogas no cérebro de adolescentes.

Tendo em vista a co-ocorrência de fumantes e consumidores de álcool adolescentes, neste estudo utilizamos exposição oral à nicotina juntamente a injeções de etanol (i.p), e quantificamos morte celular e densidade neuronal e glial em diversas regiões hipocâmpais em diversos momentos durante e após a exposição de camundongos adolescentes. Este método permite determinar se a exposição à nicotina juntamente à exposição ao etanol causa alterações mais ou menos intensas que a exposição à nicotina ou ao etanol. Resultados deste estudo podem nos fornecer informações importantes para educar adolescentes sobre os efeitos de fumar e consumir álcool, esclarecendo se a nicotina e o etanol são particularmente prejudiciais durante o desenvolvimento e identificando riscos associados à exposição combinada.

No Laboratório de Neurofisiologia do Instituto de Biologia Roberta Alcântara Gomes muito tem sido feito para preencher essa lacuna a respeito dos danos no cérebro de adolescentes com diversos estudos comportamentais (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007 e 2008; Manhaes et al., 2008) e bioquímicos (Ribeiro-Carvalho et

al., 2008 e 2009) em camundongos adolescentes. Complementando estes estudos, nosso trabalho investigou alterações morfológicas ocasionadas pelo uso abusivo de nicotina e/ou etanol num modelo experimental com camundongos adolescentes.

II – OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

1 – Investigar alterações estruturais em cinco regiões hipocâmpais escolhidas: camada Granulosa do Giro Denteado, camada Molecular e nas regiões CA1, CA2 e CA3 de camundongos C57BL/6 expostos ao etanol, à nicotina e à nicotina+etanol utilizando-se a técnica de imunomarcção pelo terminal 3'-OH do DNA pela desoxinucleotidil transferase (TUNEL).

2 – Identificar se as alterações estruturais alteram a densidade neuronal e glial nas regiões hipocâmpais escolhidas utilizando-se o método do Disector óptico.

Esses estudos foram realizados em dois momentos:

- a – ao final da exposição
- b – durante a abstinência.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Neurofisiologia do Instituto de Biologia Roberta Alcântara Gomes da UERJ. Os experimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (e estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de cuidados e uso de animais de laboratório adotado e promulgado pelo Instituto Nacional de Saúde).

Camundongos C57BL/6 foram escolhidos porque em artigos anteriores foi demonstrado que os camundongos adultos e peri-adolescentes desta linhagem consomem nicotina na concentração utilizada no presente estudo (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007 e 2008; Klein et al., 2003 e 2004; Ribeiro-Carvalho et al., 2008 e 2009; Sparks e Pauly, 1999). Os animais foram criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro num ciclo diário de 12 horas claro/escuro (claro a partir das 14 horas), temperatura controlada e mantida em torno de 21° C, com livre acesso à água e comida. Os animais foram provenientes de uma colônia de camundongos C57BL/6 mantida na Universidade Estadual de Campinas (São Paulo, Brasil) por mais de 70 gerações.

1 – Formação dos grupos experimentais

Após o nascimento, as ninhadas eram reduzidas a um máximo de oito filhotes a fim de permitir suporte nutricional adequado a todos os animais. Ao completarem 25 dias de vida pós-natal (PN25), os animais eram desmamados e separados por sexo; os irmãos do mesmo sexo permaneceram juntos até PN29, quando eram individualizados. A colocação individual dos animais pode reduzir a neurogênese e a plasticidade sináptica (Lu et al., 2003), no entanto, permitiu a medição exata do consumo de líquidos/consumo de nicotina para cada animal.

Os animais iniciaram a exposição ao etanol e/ou nicotina em PN30. Com duração de 15 dias, período que abrange a adolescência destes animais (Spear e Brake, 1983), a exposição era encerrada em PN45. Desta forma, um estudo

completo do impacto da exposição à nicotina e ao etanol durante a adolescência requereu quatro grupos experimentais:

Grupo exposto à nicotina e etanol (NIC+ETOH)

Nicotina *free base* (50µg/ml) (Sigma, St Louis, MO) foi diluída em sacarina a 2% e administrada na água que os animais bebiam (única fonte de água).

O etanol foi administrado via intraperitoneal (i.p.), 2g/Kg de etanol a 25%, em solução salina e as injeções aplicadas a cada dois dias.

Grupo exposto à nicotina (NIC)

Neste grupo os animais foram expostos à nicotina e receberam injeções de salina.

Nicotina *free base* (50µg/ml) (Sigma, St Louis, MO) foi diluída em sacarina a 2% e administrada na água que os animais bebiam (única fonte de líquido).

A salina foi administrada via intraperitoneal (i.p.) de acordo com o peso de cada animal e as injeções ocorreram a cada dois dias.

Grupo exposto ao etanol (ETOH)

Neste grupo os animais foram expostos ao etanol e receberam solução de sacarina a 2%.

O etanol foi administrado via intraperitoneal (i.p.), 2g/Kg de etanol a 25%, em solução salina e as injeções aplicadas a cada dois dias.

A solução de sacarina a 2% foi administrada na água que os animais bebiam (única fonte de líquido).

Grupo Controle (VEH)

Neste grupo os animais receberam solução de sacarina a 2% na água que os animais bebiam (única fonte de líquido) e injeções intraperitoneais (i.p) de salina a cada dois dias.

Uma vez que as injeções de etanol ocorreram em dias alternados, os animais dos grupos ETOH e NIC+ETOH, durante o período de exposição, eram submetidos a um período de intoxicação por etanol seguido por um período de retirada.

2 – Ingesta de líquido, peso corporal e ingesta/peso

A ingesta de líquido e o peso dos animais foram medidos diariamente durante o período de exposição. Ao todo, foram utilizados 233 animais (121 machos e 112 fêmeas), provenientes de 55 ninhadas. Devido ao fato do peso corporal aumentar significativamente durante a adolescência, para cada animal, os dados de consumo diário foram corrigidos dividindo-se os valores absolutos de ingesta de líquido do animal pelo seu peso corporal, gerando assim os dados de ingesta/peso.

3 – Análise Morfológica

Preparação do tecido

Ao final do período de exposição (PN45, 17 machos e 21 fêmeas) ou na abstinência: dois dias (PN47, 43 machos e 40 fêmeas) e cinco dias após a exposição (PN50, 61 machos e 51 fêmeas), os animais foram anestesiados por inalação de vapor de éter e em seguida, utilizando-se uma bomba peristáltica, esses animais foram perfundidos por via transcardíaca com solução salina 0,9% por cinco minutos para retirada de todo sangue evitando possíveis coágulos nos vasos. Depois, esses animais foram fixados com uma solução de paraformaldeído 4% por sete minutos e logo em seguida foram crioprotégidos com uma solução de paraformaldeído 4% + sacarose 20% por três minutos e decapitados. Os crânios desses animais permaneceram em solução fixadora de paraformaldeído 4% + sacarose 30% por 24 horas. Após esse período os cérebros desses animais foram dissecados, foi feito um corte coronal desprezando a região do bulbo olfatório e em seguida foram embebidos em OCT (Optimal Cutting Temperature; Sakura Finetek Inc. Torrance, CA 90501, USA), congelados em nitrogênio líquido a -96°C e mantidos num freezer a -45 °C para uma subsequente análise morfológica.

Os cérebros foram retirados do freezer a -45 °C e foram feitos cortes coronais num criostato (SLEE Mainz/MEV) a -20 °C com 25µm de espessura. Foram feitos cortes seriados com uma sequência de dois cortes colhidos em

lâminas previamente gelatinizadas, numeradas e seqüenciadas em “a” e “b”, sendo desprezados três cortes entre cada seqüência de cortes coletados.

Para a quantificação da densidade celular pelo método do Disector óptico, os cortes “a” foram corados pelo Cresil Violeta (Sigma Chemical Co St Louis, MO – USA). Para observar a morte celular, os cortes “b” dos cérebros dos camundongos foram processados para detecção de apoptose pelo método de marcação do terminal 3'-OH do DNA pela desoxinucleotidil transferase (TUNEL - In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany))

4 – Detecção de células apoptóticas

Foi feita uma análise quantitativa para avaliação da perda neuronal na camada Granulosa do giro denteado (GrDG), na camada Molecular (Mol) e nas regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de camundongos adolescentes durante o tratamento (PN45) e durante a abstinência (PN47 e PN50) tomando-se a coloração marrom do TUNEL como indicadora de positividade para célula apoptótica além da observação de características morfológicas como a condensação periférica da cromatina nuclear.

Para a detecção de células em apoptose, foi realizada a técnica do TUNEL de acordo com um protocolo padronizado e seguido pelo Laboratório de Neurofisiologia (Tabela 1).

Tabela 1 – Protocolo para coloração de TUNEL ajustado e utilizado pelo Lab de Neurofisiologia IBRAG/UERJ. Todas as etapas devem ser executadas em câmara úmida

1) Incubar em H ₂ O ₂ – 0,3% em temperatura ambiente (T.A.)	10'
2) Três banhos de PBS	5' cada
3) Incubar com Triton X 0,5% pH 7,4 em T.A.	15'
4) Três banhos de PBS	5' cada
5) TUNEL – Incubar na estufa a 37°C na proporção 1:9	90'
6) Três banhos de PBS	5' cada
7) Adicionar 50µl do Converter POD a 37°C	60' min
8) Três banhos de PBS	5' cada
9) Adicionar o DAB na proporção 1:50 a 37°C (proteger da luz)	5-7'
10) Três banhos de PBS	5' cada
11) Contracorar com Hematoxilina ou Metil Green	
12) Desidratar, clarificar e montar com Entelan	

Os cortes foram cobertos por lamínulas utilizando Entellan neu (Merck Darmstadt, Alemanha) e examinadas ao microscópio de luz (Olympus BX40).

De acordo com Franklin e Paxinos (1996), o hipocampo estende-se entre as coordenadas Bregma -0,94 até -4,04 mm. No presente estudo, as extensões antero-posteriores das regiões do hipocampo a serem quantificadas foram selecionadas dentro do intervalo entre o ponto Bregma -2,30 e -3,52 mm (Franklin e Paxinos, 1996), correspondendo a aproximadamente 40% de sua extensão. No intuito de utilizar um marco anatômico facilmente identificável para começar a quantificação, optou-se para começar as análises após o fim do núcleo habenular medial (Bregma -2,30 mm). Ficou decidido também quantificar a porção posterior apenas até a coordenada em que ambos os campos CA1 e CA3 eram facilmente identificáveis (Bregma -3,52mm). Para justificar a coleta correta dos cortes histológicos do cérebro, começamos a cortar o cérebro mais rostralmente (aproximadamente em Bregma -0,58 mm) e terminamos com cortes mais caudalmente (aproximadamente em Bregma -5,20 mm). A localização mediolateral das regiões analisadas foi identificada com base em critérios citoarquitetônicos: a GrDG é uma estrutura em forma de C composta de células granulares, medialmente localizada no giro denteado. A Mol é uma camada de baixa densidade celular localizada externamente à GrDG. As regiões CA1, CA2 e CA3 estão localizadas no corno de Amon (Ammon's Horn ou *Cornu Ammonis*). A região CA1 está localizada mais dorsalmente no corno; a região CA3 está localizada mais ventralmente e a região CA2 consiste em um pequeno campo de células localizadas entre as regiões CA1 e CA3 (Bailey et al., 2000; Burwell et al., 1995; Miki et al., 2005).

Para realização da quantificação, foi utilizada uma objetiva cujo aumento era de 40X e uma gráticula composta de 100 quadrados (10×10) micrometricamente dividida ($20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$) e impressa em uma ocular de 10X de aumento, para padronizar a contagem de cada área estudada, respeitando as características morfológicas e dimensões de cada região hipocampal.

Para a camada GrDG, em cada corte analisado foi quantificada uma área total de $16.000\mu\text{m}^2$, que corresponde a quatro fileiras da gráticula com 10 quadrados cada uma. Para camada Mol, foi quantificada uma área total de $40.000\mu\text{m}^2$, que corresponde a dez fileiras com 10 quadrados cada uma, da gráticula. Para CA1, foi quantificada uma área total de $8.000\mu\text{m}^2$, que

corresponde a duas fileiras com 10 quadrados cada uma, da gráticula. Para CA2, foi quantificada uma área total de $4.000\mu\text{m}^2$, que corresponde a uma fileira com 10 quadrados cada uma, da gráticula. E pra CA3, foi quantificada uma área total de $12.000\mu\text{m}^2$, que corresponde a três fileiras com 10 quadrados cada uma, da gráticula.

5 – Estereologia

Como descrito acima, os cortes corados pelo TUNEL apresentavam pares correspondentes para a coloração pelo Cresil Violeta, para a quantificação da densidade neuronal e glial pelo método Disector Óptico sob um microscópio de luz (Zeiss, Germany) com objetiva planacromática (100X).

Medidas de densidade neuronal

Considerando que o cresil violeta cora tanto neurônios como células de glia, para diferenciar uma célula da outra são utilizados critérios morfológicos. Comparados às células da glia, os neurônios são maiores, possuem citoplasma escuro, núcleo claro e um ou mais nucléolos. Já as células da glia apresentam núcleo mais escuro, pouco ou nenhum citoplasma visível e, muitas vezes, condensações de cromatina nas bordas do núcleo.

O método do *Disector Óptico* (Sterio, 1984) foi utilizado para a realização das medidas de densidade neuronal e glial. Resumidamente, este método consiste em estimar a densidade numérica utilizando dois planos paralelos (pares de disector) como áreas-teste em um corte espesso. A distância entre os planos superior (*look up*) e inferior (*look down*) é previamente estabelecida e não deve ser superior ao tamanho das células a serem contadas. Em seguida, é escolhido um dos planos para ser feita a contagem, enquanto o outro é considerado como proibido. Qualquer célula que cruze o plano proibido não deve ser contada, mesmo que esta esteja presente também no plano escolhido.

No presente trabalho, para cálculo da densidade neuronal e glial, o número de neurônios e células de glia foi contado em dois planos escolhidos aleatoriamente, entre os limites anterior e posterior de cada área hipocampal estudada. Em cada corte foram contados dois pares de disector para cada área

hipocampal sendo feitas cinco medidas para a camada GrDG, quatro para a camada Mol, regiões CA1 e CA3, e duas para a região CA2 em cada corte quantificado. Foram quantificados três cortes por animal: um corte anterior, outro corte posterior e outro corte eqüidistante aos dois.

Os pares de disector foram obtidos com a ajuda de um microscópio Olympus BX40, sendo considerada a distância entre os planos superior (look up) e inferior (look down) de 3µm (eixo-z). Considerando-se que, em cortes espessos, a margem do tecido adjacente à lâmina de vidro pode apresentar redução do número de partículas a serem contadas devido à incompleta penetração do corante (von Bartheld C., 2002), não foram capturadas imagens imediatamente abaixo da borda externa do corte histológico, para evitar possíveis vieses na análise dos dados.

Para cada área teste, foram considerados proibidos o plano inferior e as bordas direita e inferior. A densidade numérica (Nv) das células foi determinada através da equação $Nv = (Q-A/t \cdot At)/mm^3$, onde Q-A é o número de núcleos de neurônios ou de glia em foco apenas no plano superior (look up) e que não ultrapassasse as bordas proibidas da área teste; t é a espessura entre o pares de disector e At é a área teste.

Para muitos autores este método é considerado sem viés, pois a contagem não é afetada pelo tamanho, formato ou orientações das partículas a serem contadas, possuindo vantagens em relação aos métodos convencionais de contagem de células (Gardella et al., 2003; Mandarim-de-Lacerda, 2003).

6 – Razão Glia/Neurônio

A razão entre células gliais/neurônios foi calculada a partir dos dados de densidade neuronal e glial obtidos com o método do Disector óptico.

7 – Espessura Hipocampal

Usando os mesmos cortes utilizados para as densidades celulares foram avaliadas as espessuras das diferentes regiões do hipocampo. Como resultado,

cinco medidas foram feitas para a camada GrDG, quatro para a camada Mol, regiões CA1 e CA3, e duas para a região CA2 em cada corte quantificado. As espessuras foram medidas com o auxílio de uma escala adaptada à ocular do microscópio. A escala foi colocada perpendicularmente em relação ao limite interno de cada uma das áreas em que as medições foram efetuadas. A espessura média de cada região foi calculada e os resultados foram utilizados na análise de dados.

8 – Análise estatística

Análise dos dados de peso e ingesta/peso

Os dados são apresentados como médias e erros padrão. Para reduzir a probabilidade de erro estatístico do tipo 1 que pode resultar de testes repetidos, os resultados foram analisados inicialmente usando uma ANOVA global de repetição (ANOVAR) para os fatores TRATAMENTO de nicotina e/ou etanol e SEXO. Para os efeitos da nicotina e/ou etanol no peso corporal e na ingesta/peso, o DIA foi considerado como fator de repetição.

ANOVAs de menor ordem foram utilizadas toda vez que interações de TRATAMENTO com outros fatores foram detectadas. Diferenças entre grupos individuais ou diferenças entre as idades foram analisadas utilizando FPLSD (*Fisher Protected Least Significant Difference*) como teste *post-hoc*. Entretanto, toda vez que não havia interação entre TRATAMENTO e outros fatores, apenas o efeito do TRATAMENTO era considerado. O valor de significância assumido foi de $p < 0,05$ para o efeito do tratamento. Para interações com valor $p < 0,1$, foi avaliado se ANOVAs de menor ordem detectam efeitos de tratamento após a subdivisão dos fatores de interação (Snedecor e Cochran, 1967).

Análise da morte celular por apoptose, densidade neuronal, densidade glial, razão glia/neurônio e espessura das regiões

Os dados são apresentados como médias e erros padrão. Para reduzir a probabilidade de erro estatístico do tipo 1 que pode resultar de testes repetidos, os resultados foram analisados inicialmente usando uma ANOVA global de

repetição (ANOVA) para todos os fatores (TRATAMENTO de nicotina e/ou etanol, IDADE e SEXO) sendo os resultados log-transformados toda vez que a variância era heterogênea. Para o número de células apoptóticas marcadas positivamente pelo TUNEL, densidade neuronal, densidade glial, espessura e razão glia/neurônio a REGIÃO HIPOCAMPAL foi considerada como fator de repetição.

ANOVAs de menor ordem foram utilizadas toda vez que interações de TRATAMENTO com outros fatores foram detectadas. Diferenças entre grupos foram analisadas utilizando FPLSD como teste *post-hoc*. Entretanto, toda vez que não houve interação entre TRATAMENTO e outros fatores, apenas o efeito do TRATAMENTO foi considerado. O valor de significância assumido é de $p < 0,05$ para o efeito do tratamento. Para interações com valor $p < 0,1$, foi avaliado se ANOVAs de menor ordem detectam efeitos de tratamento após a subdivisão dos fatores de interação (Snedecor e Cochran, 1967).

Análise das interações entre nicotina e etanol

O desenho do estudo requereu duas formas diferentes de análise do efeito do tratamento com nicotina e/ou etanol. Para comparar os quatro grupos tratados (VEH, NIC, ETOH, NIC+ETOH) entre si, como descrito nos tópicos acima, uma análise unidimensional com o fator TRATAMENTO foi utilizada. Para determinar se a nicotina interfere com os efeitos do etanol ou vice versa, ou seja, se há interação entre os efeitos da exposição à nicotina e ao etanol, uma análise bidimensional foi utilizada com um fator correspondendo ao tratamento com nicotina (NICOTINA) e o outro correspondendo ao tratamento com etanol (ETANOL). Neste formato, efeitos mais-que-aditivos (sinergistas) e menos-que-aditivos aparecem como interações significativas entre as duas dimensões de tratamento (NICOTINA×ETANOL), enquanto que efeitos aditivos não apresentam interações significativas (Abreu-Villaça et al., 2004a, 2004b, 2007 e 2008; Rhodes et al., 2003; Ribeiro-Carvalho et al., 2008 e 2009).

IV – RESULTADOS

Como vimos na introdução, o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas estão fortemente associados e o início do hábito de fumar e beber ocorre com frequência durante a adolescência, período no qual alterações neuroadaptativas, hormonais e comportamentais ocorrem. Com o intuito de contribuir com informações importantes para os estudos morfológicos de co-uso e co-abuso de nicotina e/etanol e para facilitar a compreensão do texto, os resultados obtidos nesse estudo serão apresentados em três segmentos:

- 1) Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência na ingesta de líquido/peso corporal e peso corporal dos animais durante o tratamento;
- 2) Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência no final do período de tratamento nas medidas de morte celular por apoptose, densidade neuronal e glial e espessura nas regiões hipocâmpais: GrDG, Mol, CA1, CA2 e CA3
- 3) Efeitos da retirada das drogas dois (PN47) e cinco dias (PN50) após a exposição nas medidas de morte celular por apoptose, densidade neuronal e glial e espessura nas regiões hipocâmpais: GrDG, Mol, CA1, CA2 e CA3

1 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NICOTINA E/OU AO ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA NA INGESTA DE LÍQUIDO/PESO CORPORAL E PESO CORPORAL DOS ANIMAIS TRATADOS.

1.1 – Efeitos sobre o peso corporal (Figura 1)

Como indicado pela ANOVA global de repetição, o peso corporal aumentou durante o período de exposição (DIA: $F_{14, 3150}=828,0$; $P < 0,001$); entretanto, este aumento não foi dependente do tratamento (não houve interação DIA $\times$ TRATAMENTO). Como esperado, houve efeito do SEXO ($F_{14, 3150}=15,0$; $P < 0,001$) devido ao fato de machos pesarem mais que fêmeas.

1.2 – Efeitos sobre a ingesta de líquido/peso corporal (Figura 2)

Com relação à proporção ingesta/peso corporal, ANOVA demonstrou um aumento durante o período de exposição (DIA: $F_{14,3150}=33,8$; $P<0,001$); sendo este aumento dependente do tratamento (TRATAMENTO: $F_{3,225}=5,58$; $P=0,004$). O efeito do tratamento pode ser explicado pelo fato do grupo VEH apresentar maiores valores de ingesta/peso quando comparado com os demais grupos (VEH>NIC; VEH>ETOH; VEH>NIC+ETOH: $p<0,0001$). Estes resultados foram confirmados na análise individual para cada dia de tratamento, quando ANOVAs de menor ordem indicaram que os grupos diferiram entre si na maioria dos dias (3º; 6º; 7º; 8º; 9º; 10º; 11º; 12º e 13º dias). Para todos os dias citados acima, o grupo VEH apresentou maior valor de ingesta/peso quando comparado ao grupo NIC. O grupo VEH também apresentou maior valor de ingesta/peso que grupo NIC+ETOH para os mesmos dias citados acima. Finalmente as diferenças entre o grupo VEH e ETOH descritas acima só atingiram significância no 7º, 11º e 13º dias quando o grupo VEH apresentou um valor maior de ingesta/peso que o grupo ETOH.

Adicionalmente, a análise bidimensional não demonstrou interações entre as dimensões NICOTINA e ETANOL, indicando assim que as alterações descritas no grupo NIC+ETOH refletiram efeito aditivo da nicotina e do etanol. Estes resultados, juntamente à ausência de diferenças entre os grupos NIC e NIC+ETOH assim como o fato do grupo ETOH diferir do grupo VEH somente em três dias do tratamento indicam que a exposição à nicotina proporcionou uma redução significativa na ingesta/peso, provavelmente devido a um efeito aversivo ao gosto da solução de nicotina e que as injeções de etanol tiveram pouca influência na determinação da ingesta de líquido.

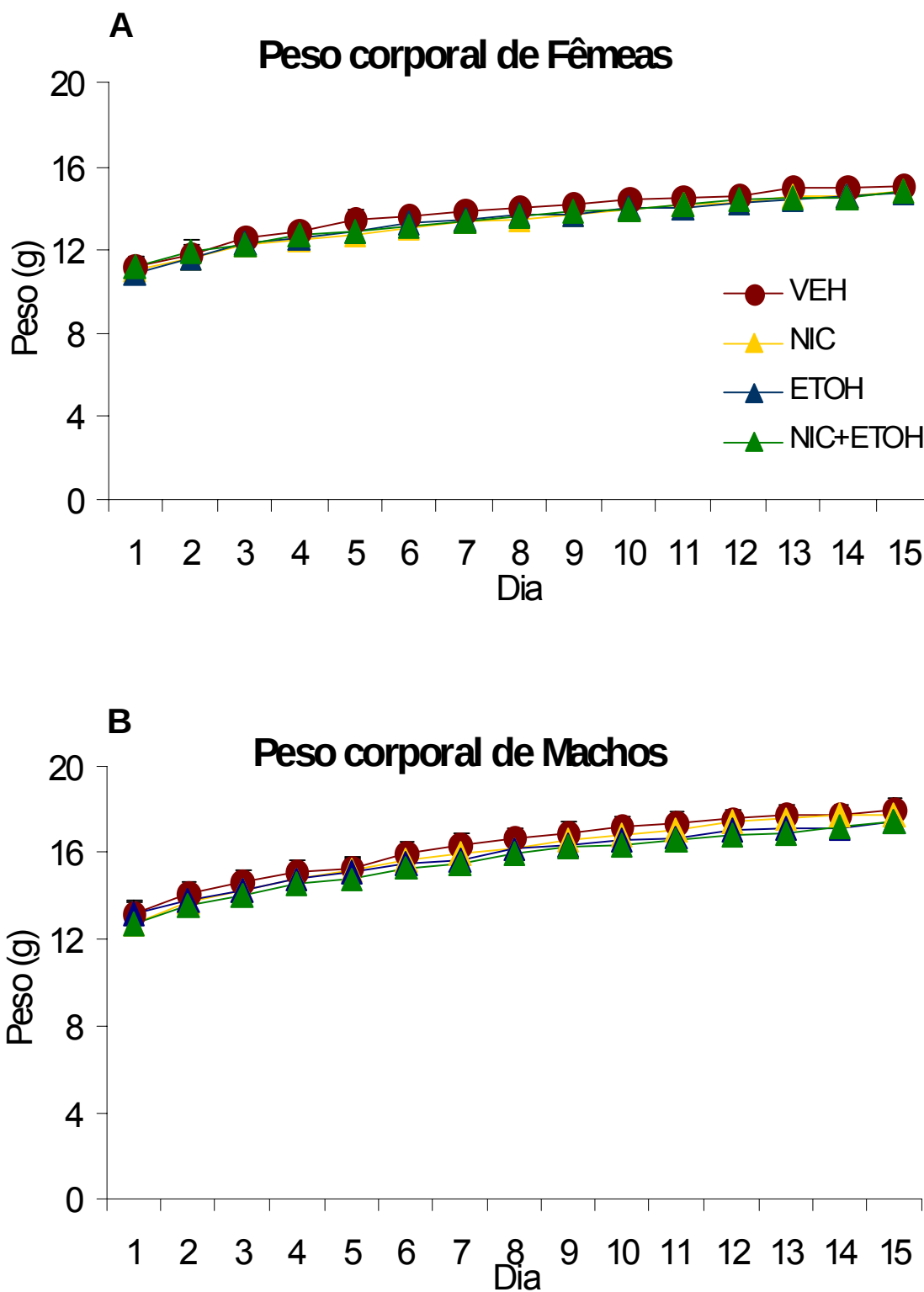


Figura 1 – Gráficos mostrando o ganho de peso dos animais experimentais ao longo do período de exposição. A) Fêmeas e B) Machos. Valores apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH, grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH, grupo exposto à nicotina+ethanol.

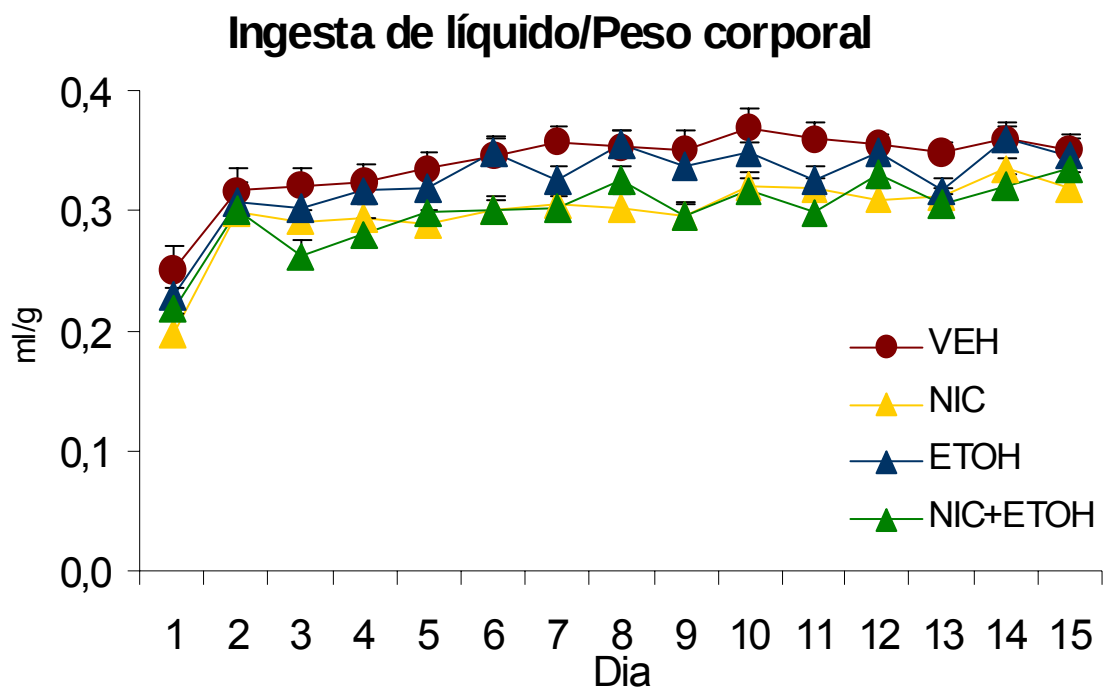


Figura 2 – Gráfico mostrando a relação da ingesta/peso durante o período de exposição para os grupos de tratamento. Valores apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH, grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH, grupo exposto à nicotina+ethanol.

ARTIGO 1 – Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência no final do período de tratamento (PN45)

Este primeiro trabalho foi publicado em 2009 no periódico internacional *International Journal of Developmental Neuroscience* (fator de impacto 2007=2,59) sendo intitulado: “Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice” (2009, 27: 539–548). O artigo completo compõe o ANEXO desta tese.

Os resultados de morte celular por apoptose foram apresentados na XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE) em 2007 e no 1º Congresso de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica (IBRO/LARC) em 2008.

Os resultados de densidade neuronal e glial foram apresentados na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE) em 2009.

Em resumo, foi avaliado o efeito da nicotina e/ou etanol em algumas regiões do hipocampo ao final do período de exposição durante a adolescência de camundongos C57BL/6. Neste artigo foi mostrado que em todas as regiões do hipocampo analisadas (GrDG, Mol, CA1, CA2 e CA3), a nicotina promoveu um aumento do número de células marcadas positivamente pelo TUNEL, o etanol promoveu um efeito mais robusto que a nicotina e as duas drogas administradas juntas promoveram um efeito menos que aditivo quando comparado com as drogas administradas sozinhas. Em relação à densidade, a nicotina promoveu uma redução da densidade neuronal e glial, o etanol promoveu uma redução mais robusta enquanto as duas drogas administradas juntas promoveram um efeito menos que aditivo quando comparado com as drogas administradas em separado.

2 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NICOTINA E/OU AO ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA NO FINAL DO PERÍODO DE TRATAMENTO (PN45)

2.1 – Morte celular por apoptose (Figuras 3 e 4)

Com a técnica do TUNEL para marcação de núcleos picnóticos, observamos no grupo VEH, células positivas para TUNEL em todas as regiões do hipocampo estudadas, indicando que os neurônios morrem pelo mecanismo de apoptose durante a adolescência, o que confirma estudos anteriores (Uysal et al., 2005).

A ANOVA global de repetição unidimensional (para quatro níveis: VEH, NIC, ETOH e NIC+ETOH) incluindo TRATAMENTO e SEXO como fatores e as REGIÕES HIPOCAMPASIS como fator de repetição, indicou efeito significativo do TRATAMENTO ($F_{3,29}=42,6$; $P<0,001$). Adicionalmente, a análise bidimensional indicou que houve interação entre os dois tratamentos (NICOTINA×ETHANOL: $F_{1,29}=95,2$; $P<0,001$) e entre os tratamentos e as REGIÕES HIPOCAMPASIS (NICOTINA×ETHANOL×REGIÕES HIPOCAMPASIS: $F_{4,116}=2,0$; $P=0,09$). Desta forma, as diferenças entre os grupos experimentais foram re-analisadas considerando-se cada região hipocampal em separado e os resultados foram reexaminados. Os tratamentos também interagiram com o sexo: NICOTINA×ETHANOL×SEXO ($F_{1,29}=3,1$; $P=0,09$) e por isso mantivemos o fator SEXO na análise.

ANOVAs unidimensionais para cada região hipocampal mostraram efeito do TRATAMENTO para todas as regiões hipocampais: camada Granulosa do Giro Denteado GrDG ($F_{3,30}=20,2$; $P<0,001$), Mol ($F_{3,30}=31,3$; $P<0,001$); CA1 ($F_{3,30}=38,7$; $P<0,001$); CA2 ($F_{3,30}=12,2$; $P<0,001$); CA3 ($F_{3,30}=46,9$; $P<0,001$).

A análise *post-hoc* indicou que o número de células que sofrem apoptose no grupo de animais que foi tratado com etanol é maior que o número de células que sofrem apoptose no grupo VEH em todas as regiões analisadas ($P<0,0001$, FPLSD).

O grupo NIC apresentou resposta menos severa e dependente da região analisada: o aumento do número de células marcadas pelo TUNEL foi significativo na camada Molecular ($P<0,03$ FPLSD) e na camada CA1 ($P<0,002$ FPLSD) quando comparado com o grupo VEH.

Os animais do grupo NIC+ETOH mostraram redução do número de células marcadas pelo TUNEL quando comparados aos grupos ETOH e NIC para todas

as regiões do hipocampo. Não houve diferenças em relação ao grupo VEH. Adicionalmente, a análise bidimensional mostrou interação entre as dimensões NICOTINA e ETANOL para todas as regiões hipocampus: camada Granulosa do Giro Denteado (F 1,30=37,7; $P<0,001$); camada Molecular (F 1,30=61,2; $P<0,001$); CA1 (F 1,30=81,9; $P<0,001$); CA2 (F 1,30=27,7; $P<0,001$) e CA3 (F 1,30=76,4; $P<0,001$), indicando efeito menos que aditivo de NICOTINA e ETANOL: o efeito neurotóxico do etanol e da nicotina quando administrados isoladamente são mais severos que o efeito do tratamento combinado. Não houve interação entre tratamento e sexo, indicando que o sexo dos animais não é um fator determinante para o número de células apoptóticas nos grupos experimentais.

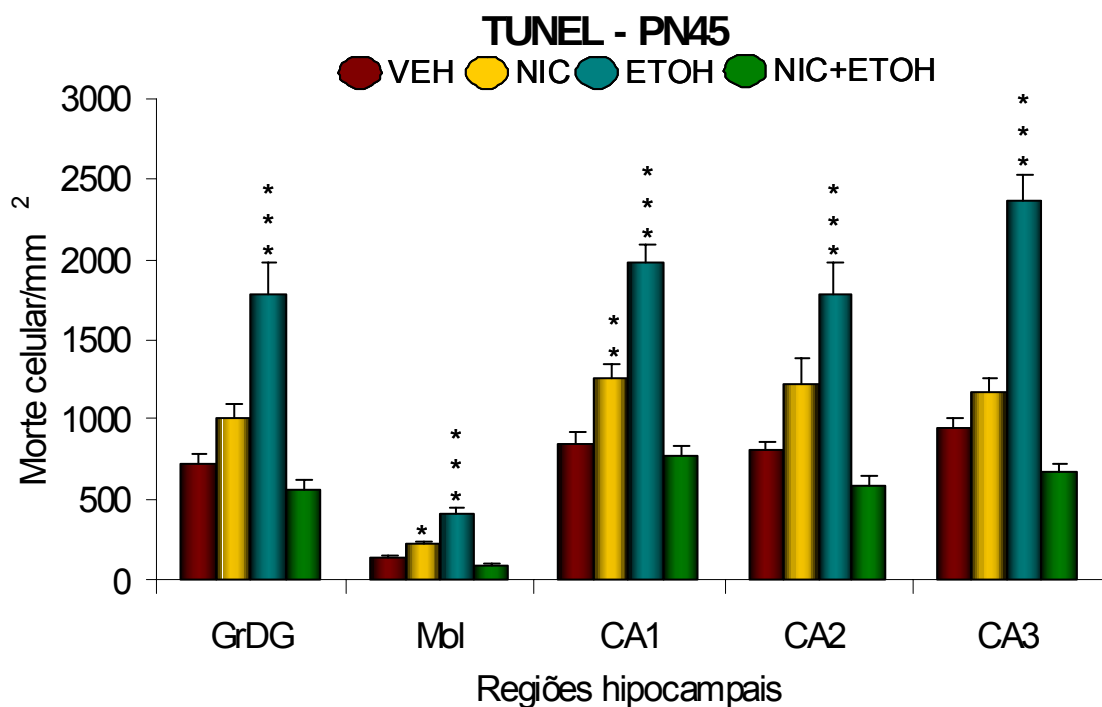


Figura 3 – Efeitos dos tratamentos com nicotina e/ou etanol no cérebro adolescente mostrando nº de células marcadas pelo TUNEL no final da exposição (PN45). Valores apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ vs. grupo veículo como indicado pelo FPLSD.

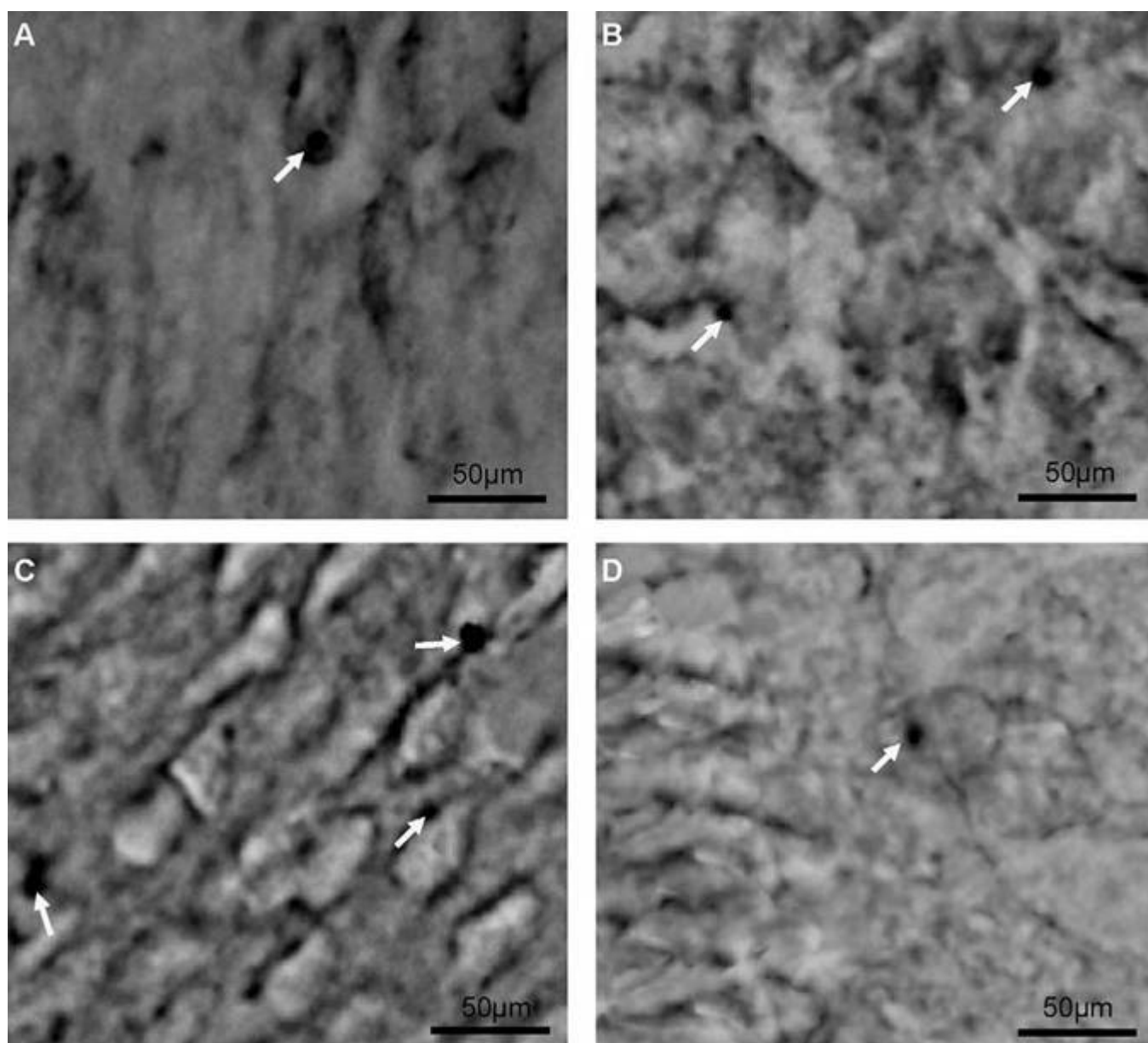


Figura 4 – Fotomicrografias representativas de células apoptóticas marcadas pelo método do TUNEL (setas brancas) na camada CA3 do hipocampo de camundongos adolescentes ao final do período de exposição (PN45). A – animal do grupo veículo; B – animal do grupo exposto à nicotina; C – animal do grupo exposto ao etanol; D – animal do grupo exposto à nicotina+etanol.

2.2 – Densidade neuronal (Figuras 5 e 7)

A ANOVA global de repetição, usando o desenho unidimensional (para quatro níveis: VEH, NIC, ETOH e NIC+ETOH) incluindo TRATAMENTO e SEXO como fatores e as REGIÕES HIPOCAMPAIS como medidas de repetição, indicou efeito significativo do TRATAMENTO ($F_{3,25}=6,8$; $P=0,001$), porém, não houve interações entre TRATAMENTO $\times$ REGIÕES HIPOCAMPAIS. Portanto, ANOVAs unidimensionais para as diferentes regiões hipocampus não se justificaram. NIC ($P<0,05$), ETOH ($P<0,001$) e os tratamentos combinados NIC+ETOH ($P=0,03$) promoveram uma diminuição na densidade neuronal quando comparados com os animais do grupo veículo. Adicionalmente, a análise bidimensional mostrou interação entre NICOTINA e ETHANOL ($F_{1,25}=10,1$; $P=0,004$), indicando que os efeitos da exposição combinada refletem efeitos menos que aditivos da nicotina e do etanol.

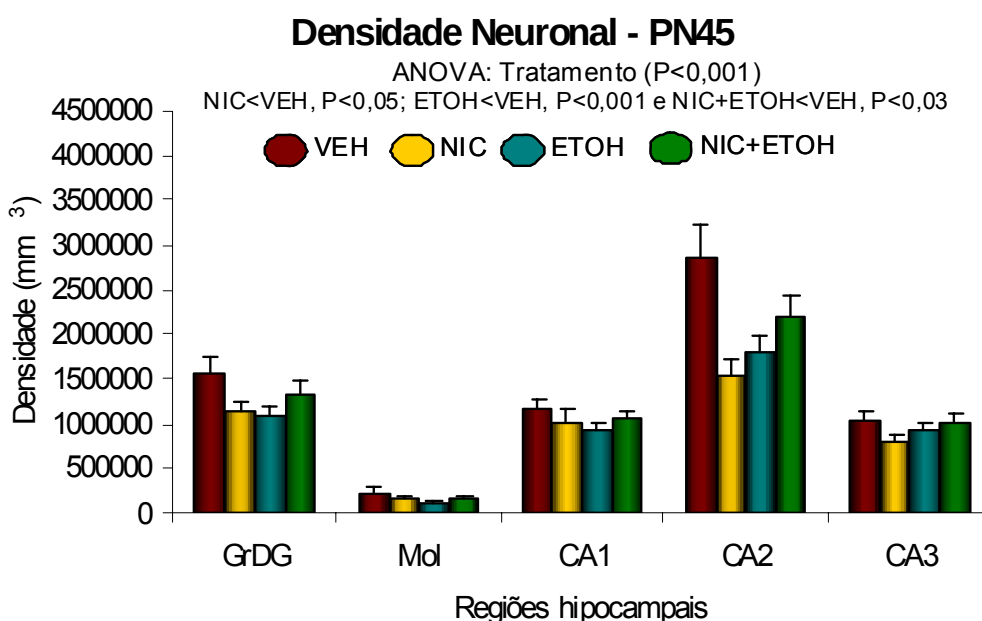


Figura 5 – Efeito do tratamento de nicotina e/ou etanol sobre a densidade neuronal nas regiões hipocampus ao final do período de exposição (PN45). Os grupos expostos à nicotina, etanol e nicotina+etanol apresentaram diminuição na densidade neuronal, quando comparados com o grupo VEH. Valores são apresentados na escala logarítmica como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina+etanol. As diferenças entre os grupos foram reveladas pelo FPLSD.

2.3 – Densidade glial (Figura 6 e 7)

Semelhante aos dados para neurônios, uma ANOVA global de repetição foi feita para avaliar a densidade glial indicando um efeito significativo do tratamento ($F_{3,25}=6,8$; $P=0,002$) e ANOVAs para as diferentes regiões hipocâmpais não se justificaram. NIC ($P<0,05$), ETOH ($P<0,001$) e os tratamentos combinados NIC+ETOH ($P=0,02$) promoveram uma diminuição na densidade glial quando comparados com os animais do grupo VEH. Adicionalmente, a análise bidimensional mostrou interação entre NICOTINA e ETHANOL ($F_{1,25}=8,8$; $P=0,006$), indicando que os efeitos da exposição combinada refletem efeitos menos que aditivos da nicotina e do etanol.

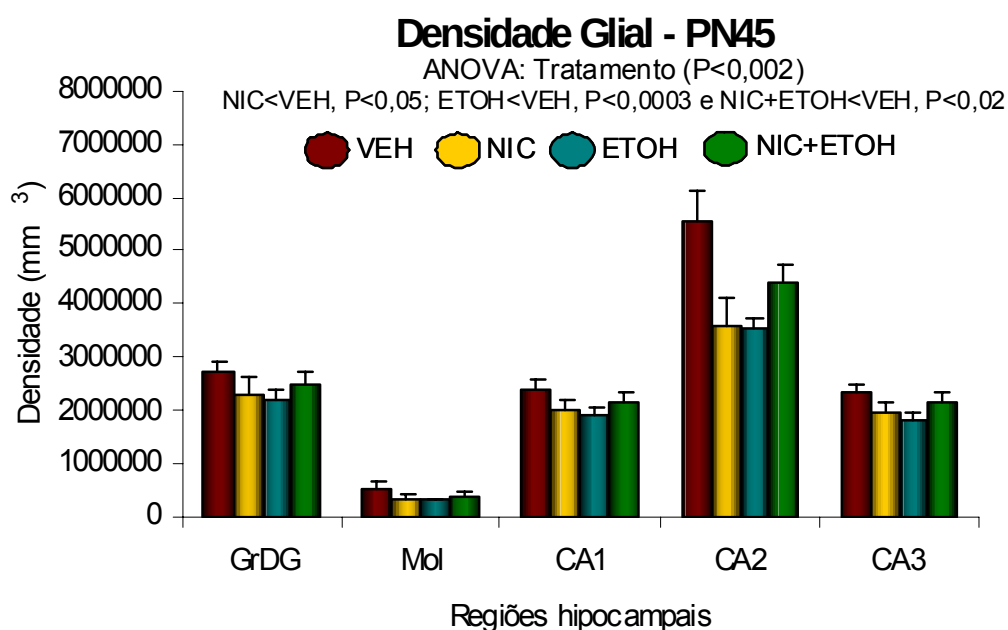


Figura 6 – Efeito do tratamento de nicotina e/ou etanol sobre a densidade glial nas regiões hipocâmpais ao final do período de exposição (PN45). Os grupos expostos à nicotina, etanol e nicotina+etanol apresentaram diminuição na densidade glial quando comparados com o grupo veículo. Valores são apresentados na escala logarítmica como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol. As diferenças entre os grupos foram reveladas pelo FPLSD.

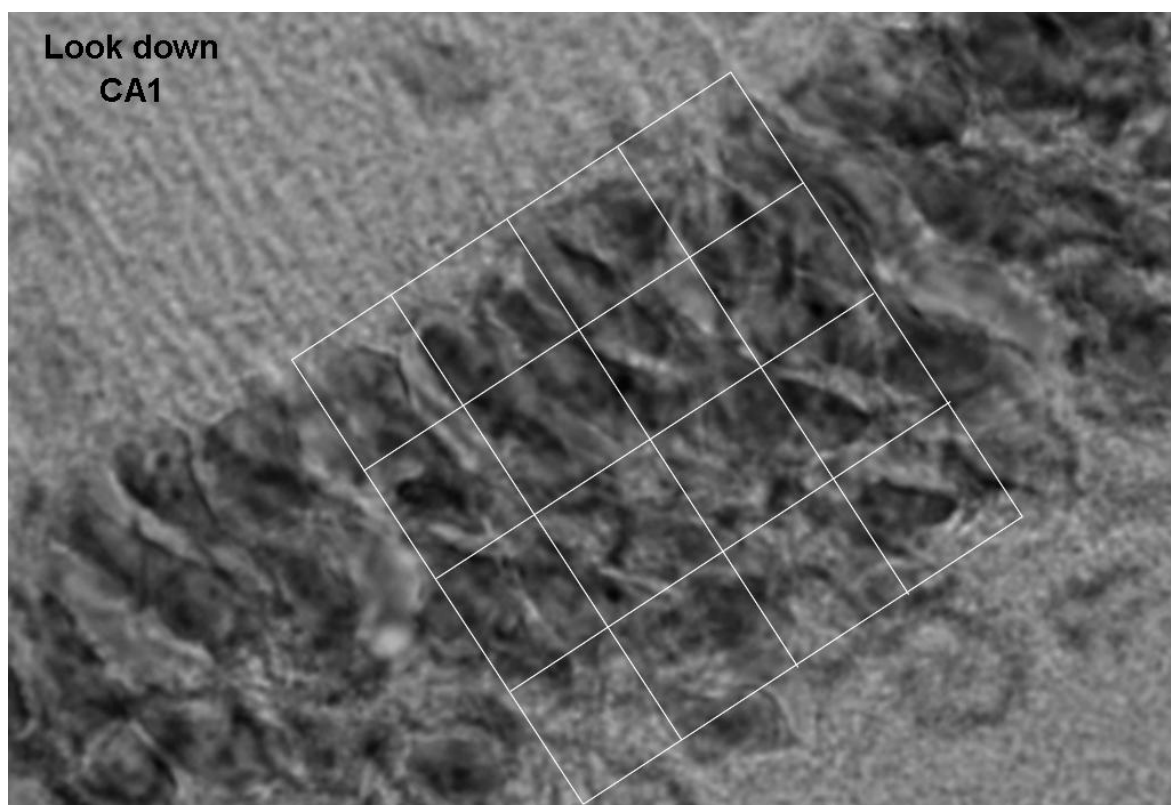
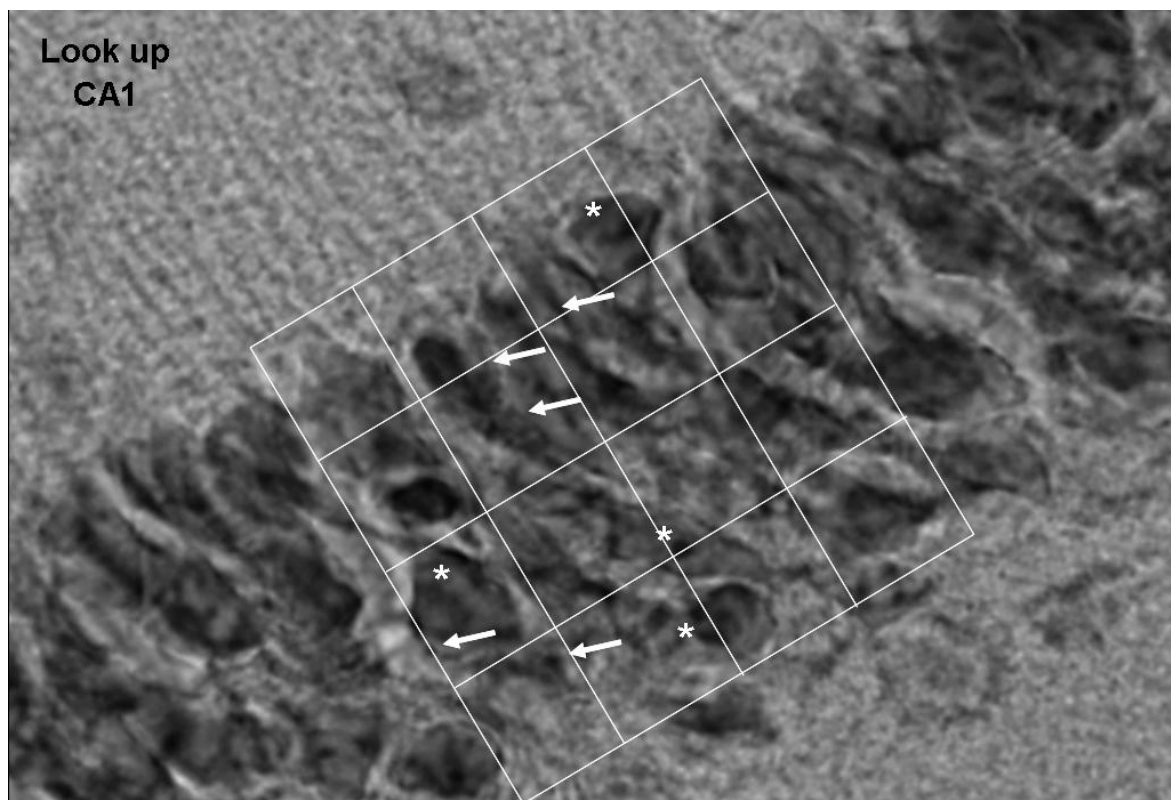


Figura 7 – Fotomicrografias representativas da coloração de Nissl mostrando um par de Disector da região CA1 do hipocampo de um cérebro de camundongo do grupo veículo ao final do período de exposição (PN45). Neurônios (asteriscos) foram diferenciados de células da glia (setas brancas) pela forma do núcleo com nucléolo evidente e grande diâmetro nuclear e com cromatina abundante enquanto glia apresenta núcleo menor com escassa cromatina e citoplasma claro.

2.4 – Razão entre células gliais/neurônios (Tabela 2)

A razão células da glia/neurônios variou de acordo com a região hipocampal analisada ($F_{4,100}=3,7$; $P=0,008$), contudo, essa razão não foi afetada pelos tratamentos nicotina e/ou etanol.

Tabela 2 – Razão entre células gliais/neurônios

	GrDG	Mol	CA1	CA2	CA3
VEH	1,99	3,03	1,91	2,05	2,16
NIC	1,92	2,58	1,98	2,22	2,38
ETOH	2,03	2,01	2,08	2,12	2,24
NIC+ETOH	1,92	2,28	1,86	2,19	2,10

2.5 – Espessuras das regiões (Figura 8)

ANOVA unidimensional e bidimensional indicaram que a espessura das diferentes regiões hipocampus analisadas não foram afetadas por nenhuma das duas drogas utilizadas nesse estudo, indicativo de que não houve efeito dos tratamentos nem interações entre eles.

Espessura - PN45

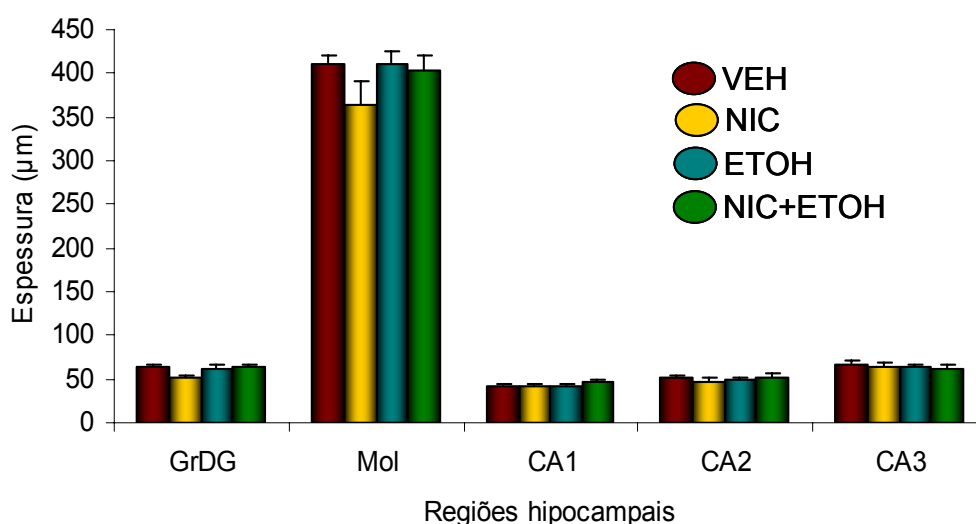


Figura 8 – Efeito do tratamento de nicotina e/ou etanol sobre a espessura das regiões hipocampus estudadas ao final do período de exposição (PN45). Não houve diferenças significativas entre os grupos. Valores são apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol.

ARTIGO 2 – Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a abstinência dois (PN47) e cinco dias (PN50) após a retirada do tratamento

Este segundo trabalho foi submetido em 2009 para o periódico internacional *Neuroscience* (fator de impacto 2007=3,35) sendo intitulado: "Hippocampal Increased Cell death and Decreased Cell Density Elicited by Nicotine and/or Ethanol during Adolescence are Reversed with Prolonged Drug Withdrawal" (Submetido). O artigo completo compõe o ANEXO desta tese.

No presente estudo, foram investigados os efeitos da abstinência da nicotina e/ou etanol nas seguintes regiões hipocâmpais: GrDG, Mol, CA1, CA2 e CA3. Foram avaliados: morte celular pela técnica do TUNEL, densidade neuronal e glial pelo método do Disector óptico e espessuras das regiões dois e cinco dias após a retirada do tratamento.

Com dois dias de abstinência (PN47) houve aumento do número de células TUNEL+ na maioria das regiões hipocâmpais analisadas, para os grupos tratados com etanol e nicotina isoladamente, porém, no grupo tratado com nicotina+etanol os efeitos foram menos severos. Paralelamente, foi observado redução da densidade neuronal e glial para todos os grupos de tratamento. Inversamente, após cinco dias de retirada (PN50) da nicotina e/ou etanol, houve uma redução compensatória nas células TUNEL+ em todas as regiões hipocâmpais analisadas. Esses resultados associados ao aumento da densidade neuronal e glial foram semelhantes para todos os grupos tratados e não houve diferenças entre os grupos. Não foram identificados efeitos da nicotina e/ou etanol nas espessuras das regiões hipocâmpais analisadas em PN47 nem em PN50.

Esses resultados sugerem que os efeitos deletérios da nicotina e/ou do etanol são revertidos durante a abstinência prolongada.

3 – EXPOSIÇÃO À NICOTINA E/OU AO ETANOL DURANTE A ADOLESCÊNCIA: EFEITOS DOIS (PN47) E CINCO DIAS (PN50) APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO

3.1 – Morte celular por apoptose – Análise global

Com a técnica do TUNEL para marcação de núcleos picnóticos, observamos no grupo VEH, células positivas para TUNEL em todas as regiões do hipocampo estudadas, indicando que os neurônios morrem pelo mecanismo de apoptose durante a adolescência (Uysal et al., 2005).

A ANOVA global de repetição, usando o desenho unidimensional (para quatro níveis: VEH, NIC, ETOH e NIC+ETOH) utilizando como fatores TRATAMENTO, IDADE e SEXO e as REGIÕES HIPOCAMPASIS como fator de repetição, indicou efeito significativo do TRATAMENTO ($F_{3,83}=11,0$; $P<0,001$), e interações entre: TRATAMENTO×REGIÕES HIPOCAMPASIS ($F_{12,332}=2,4$; $P=0,004$), TRATAMENTO×IDADE ($F_{3,83}=11,3$; $P<0,001$) e TRATAMENTO×REGIÕES HIPOCAMPASIS×IDADE ($F_{12,332}=2,3$; $P=0,008$). Adicionalmente, a análise bidimensional indicou que houve interação entre os dois tratamentos (NICOTINA×ETANOL: $F_{1,83}=8,5$; $P=0,004$); TRATAMENTO×REGIÕES HIPOCAMPASIS ($F_{4,332}=2,8$; $P<0,03$); TRATAMENTO×IDADE ($F_{1,83}=15,0$; $P<0,001$) e REGIÕES HIPOCAMPASIS×IDADE ($F_{4,332}=4,3$; $P=0,002$). A partir desses resultados os dados foram re-analisados separadamente para cada região hipocampal e para cada idade (PN47) e (PN50). Não houve interações entre TRATAMENTO e SEXO.

3.1.1 – Morte celular em PN47 (Figura 9 e10)

Em PN47, ANOVAs unidimensionais para cada região hipocampal mostraram efeito significativo do TRATAMENTO para todas as regiões hipocampais: GrDG ($F_{3,39}=18,8$; $P<0,001$), Mol ($F_{3,39}=30,0$; $P<0,001$); CA1 ($F_{3,39}=14,8$; $P<0,001$); CA2 ($F_{3,39}=7,3$; $P<0,001$); CA3 ($F_{3,39}=21,4$; $P<0,001$).

A análise *post-hoc* indicou que o a abstinência do etanol provocou um aumento do número relativo de células que sofreram apoptose em todas as regiões analisadas. Dois dias de abstinência da nicotina provocaram um efeito região-dependente: o número de células positivas para TUNEL estava

significativamente maior nas regiões: GrDG, Mol, CA1 e CA3 em comparação com o grupo VEH, mas esse efeito não foi significativo em CA2. Abstinência do tratamento NIC+ETOH provocou um efeito menos severo, entretanto também provocou aumento das células positivas para TUNEL quando comparado com o grupo VEH, porém, essa diferença só foi detectada na camada Mol.

Os efeitos menos severos do tratamento NIC+ETOH foram confirmados pela análise bidimensional. Esse tipo de ANOVA mostrou interação entre as dimensões NICOTINA e ETANOL para todas as regiões hipocâmpais: GrDG (F 1,39=48,0; P<0,001); Mol (F 1,39=55,9; P<0,001); CA1 (F 1,39=36,4; P<0,001); CA2 (F 1,39=8,1; P<0,007) e CA3 (F 1,39=40,3; P<0,001), indicando efeito menos que aditivos entre NICOTINA e ETANOL.

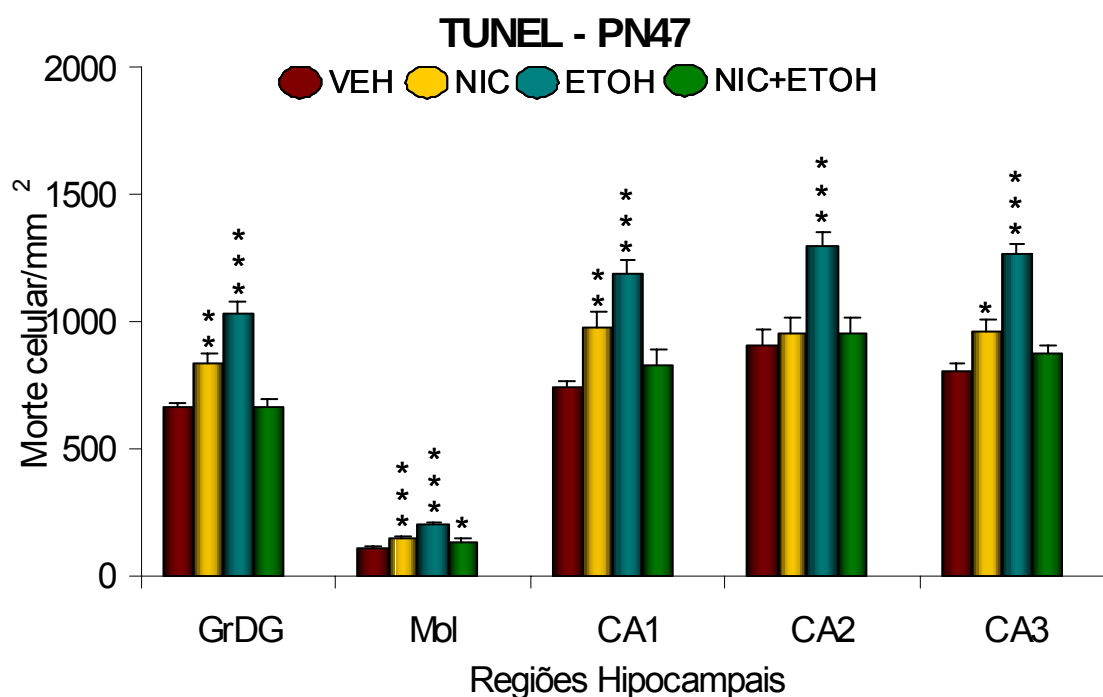


Figura 9 – Número de células marcadas positivamente pelo TUNEL dois dias após a retirada do tratamento com nicotina e/ou etanol durante a adolescência (PN47). Valores apresentados como médias±EPM. VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. grupo veículo como indicado pelo FPLSD.

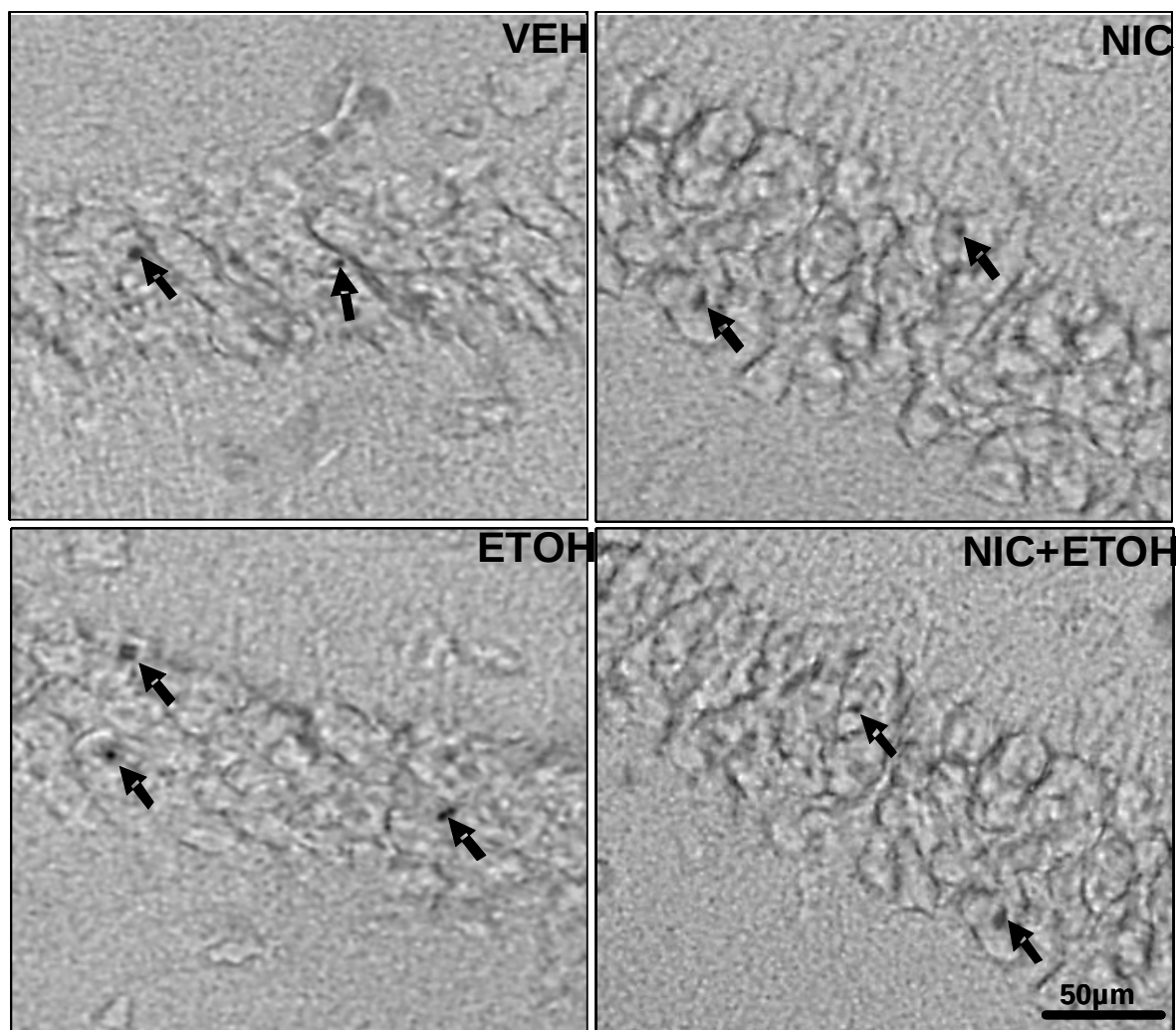


Figura 10 – Fotomicrografias representativas de células apoptóticas marcadas pelo método do TUNEL (setas pretas) na camada CA1 do hipocampo de camundongos adolescentes dois dias após a exposição (PN47). VEH – animal do grupo veículo; NIC – animal do grupo exposto à nicotina; ETOH – animal do grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH – animal do grupo exposto à nicotina+etanol.

3.1.2 – Morte celular em PN50 (Figura 11 e 12)

Em PN50, ANOVAs unidimensionais para cada região hipocampal também indicaram efeito significativo do TRATAMENTO para todas as regiões: GrDG (F 3,44=14,9; P<0,001), Mol (F 3,44 = 12,3; P<0,001); CA1 (F 3,44=4,5; P<0,008); CA2 (F 3,44=5,5; P<0,003) e CA3 (F 3,44=4,7; P<0,006). Contudo, houve um claro contraste entre os resultados encontrados em PN47 e PN50.

Com cinco dias de abstinência de nicotina e/ou etanol, houve redução no número de células apoptóticas em comparação com o grupo VEH: o grupo ETOH apresentou redução nas células positivas para TUNEL nas camadas GrDG; CA1, CA2 e CA3. Não houve alterações significativas na camada Mol. Com cinco dias de abstinência de nicotina, houve reduções significativas em todas as regiões hipocampus quando comparadas com o grupo VEH, sendo o mesmo padrão de resultados identificado no grupo NIC+ETOH. Para as regiões hipocampus GrDG, Mol e CA1, os efeitos de cinco dias de abstinência de nicotina+etanol foram mais brandos que a soma dos efeitos individuais da nicotina e do etanol (foram detectadas interações entre NICOTINA e ETANOL nas regiões GrDG: F 1,44=9,04; P=0,004; Mol: F 1,44=3,2; P<0,08 e CA1: F 1,44=3,1; P=0,08). Para as regiões CA2 e CA3 ANOVAs bidimensionais não detectaram interações significativas entre NICOTINA e ETANOL indicando que os efeitos observados com as duas drogas juntas refletiram a soma dos efeitos das drogas quando administradas separadamente.

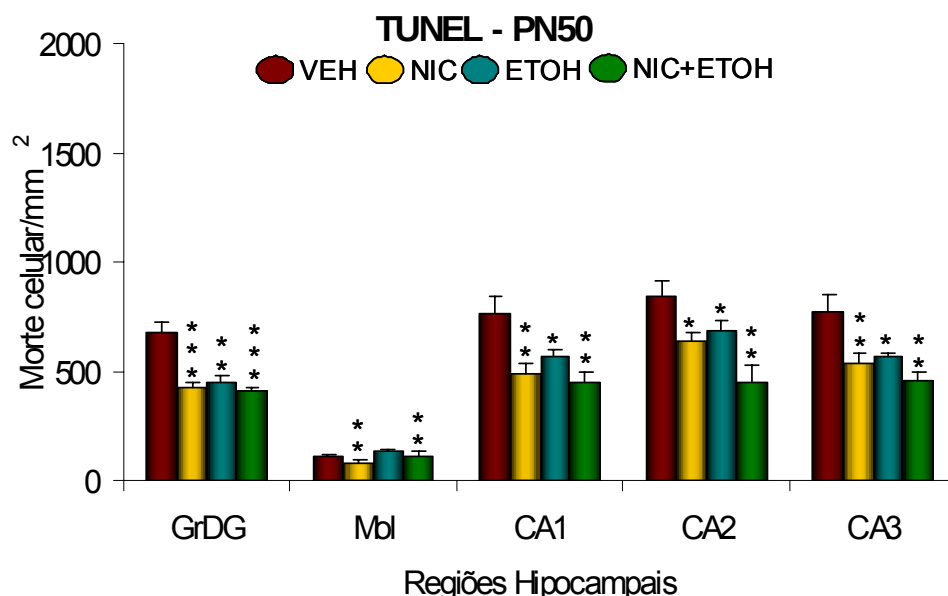


Figura 11 – Efeito da nicotina e/ou etanol no cérebro adolescente mostrando o número de células marcadas positivamente pelo TUNEL cinco dias após a retirada do tratamento (PN50). Valores apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo VEH; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. grupo veículo como indicado pelo FPLSD.

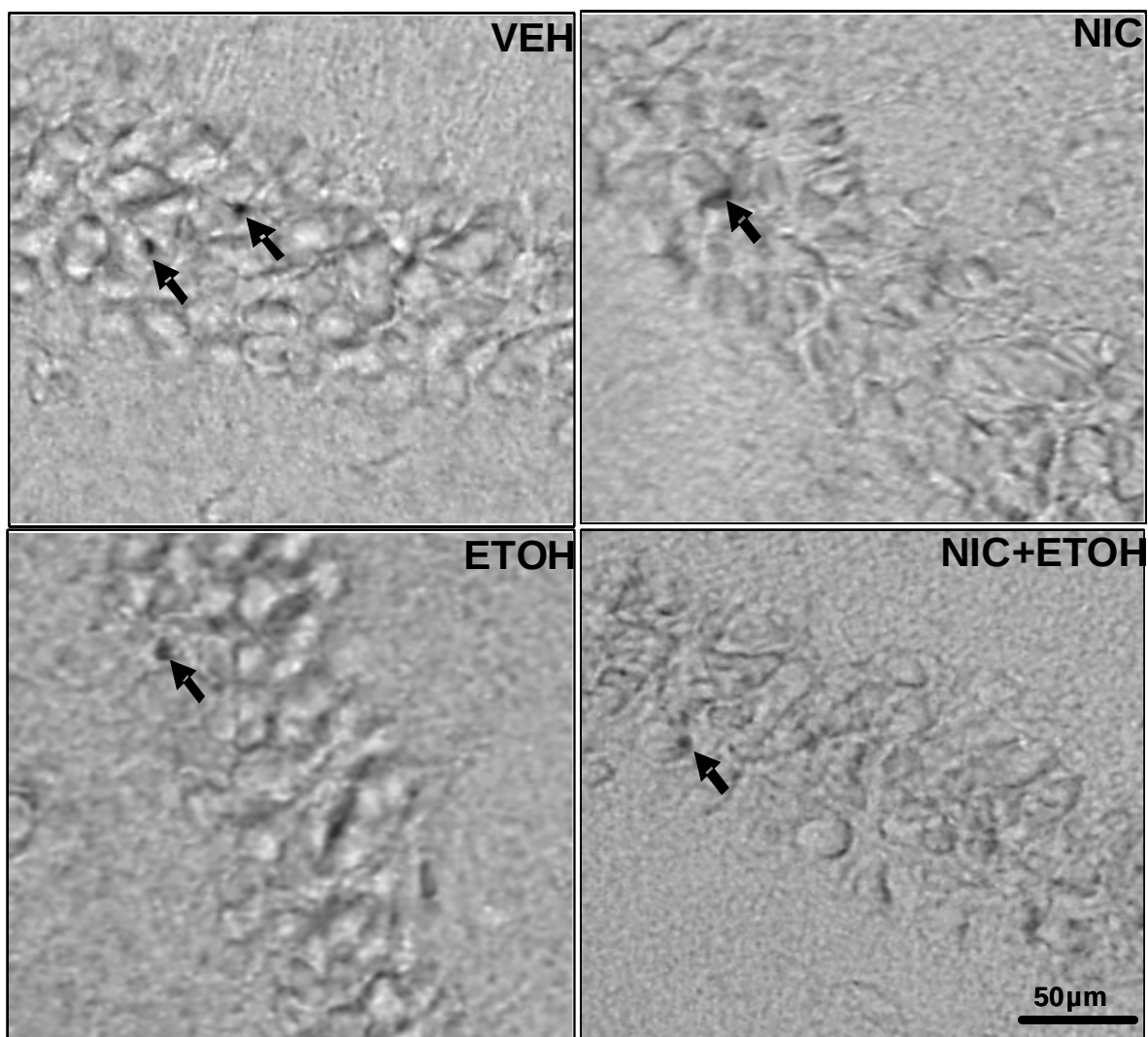


Figura 12 – Fotomicrografias representativas de células apoptóticas marcadas pelo método do TUNEL (setas pretas) na camada CA1 do hipocampo de camundongos adolescentes cinco dias após a exposição (PN50). VEH – animal do grupo veículo; NIC – animal do grupo exposto à nicotina; ETOH – animal do grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH – animal do grupo exposto à nicotina+etanol.

3.2 – Densidade neuronal – Análise global

A ANOVA global de repetição, usando o desenho unidimensional indicou efeito significativo do TRATAMENTO ($F_{3,50}=7,8$; $P=0,001$) e interações entre: TRATAMENTO×REGIÕES HIPOCAMPAIS ($F_{12,200}=3,4$; $P=0,001$), TRATAMENTO×IDADE ($F_{3,50}=4,3$; $P<0,009$), TRATAMENTO×REGIÕES HIPOCAMPAIS×IDADE ($F_{12,200}=2,8$; $P=0,001$). Com a nicotina e o etanol sendo considerados fatores separados, a análise bidimensional mostrou interações entre NICOTINA×ETHANOL ($F_{1,50}=7,2$; $P=0,01$) e NICOTINA×ETHANOL×REGIÕES HIPOCAMPAIS ($F_{4,200}=7,0$; $P<0,001$); NICOTINA×ETHANOL×IDADE ($F_{1,50}=4,3$; $P<0,04$) e NICOTINA×ETHANOL×REGIÕES HIPOCAMPAIS×IDADE ($F_{4,200}=5,6$; $P<0,001$). Devido a esses resultados, analisamos novamente os dados separadamente para cada região hipocampal e para cada idade. Nicotina e etanol também interagiram com SEXO (TRATAMENTO×IDADE×SEXO: $F_{3,200}=2,7$; $P=0,06$; NICOTINA ×ETHANOL×REGIÕES HIPOCAMPAIS×IDADE×SEXO: $F_{12,200}=1,7$; $P=0,06$; NICOTINA×ETHANOL×REGIÕES HIPOCAMPAIS×IDADE×SEXO: $F_{1,50}=3,2$; $P=0,08$), assim, após subdividir os dados por região e por idade, foi mantida na análise essa variável.

3.2.1 – Densidade neuronal em PN47 (Figura 13)

Em PN47, ANOVAs unidimensionais para cada região hipocampal mostraram efeito significativo do TRATAMENTO para: Mol ($F_{3,25}=17,0$; $P<0,001$); CA1 ($F_{3,25}=7,9$; $P<0,001$); CA2 ($F_{3,25}=3,7$; $P=0,03$) e CA3 ($F_{3,25}=10,3$; $P<0,001$). A análise *post-hoc* indicou uma diminuição da densidade neural durante a abstinência da nicotina, do etanol e da nicotina+etanol comparado com o grupo VEH. Não houve efeito significativo do tratamento para GrDG ($F_{3,25}=2,53$; $P=0,09$). Analisando os dados com os tratamentos Nicotina e Etanol numa análise bidimensional, foi encontrado efeito do tratamento sendo esse efeito dependente da região. Houve interações significativas entre NICOTINA e ETANOL para as regiões Mol ($F_{1,25}=44,7$; $P<0,001$), e CA3 ($F_{1,25}=3,4$; $P=0,07$) indicando um efeito menos que aditivo da abstinência de nicotina e de etanol. Em contrapartida, para as regiões CA1 e CA2, ANOVAs não mostraram interações significativas entre esses fatores indicando que os efeitos da abstinência de nicotina e do etanol refletiram a soma dos efeitos da abstinência da nicotina e do etanol isoladamente.

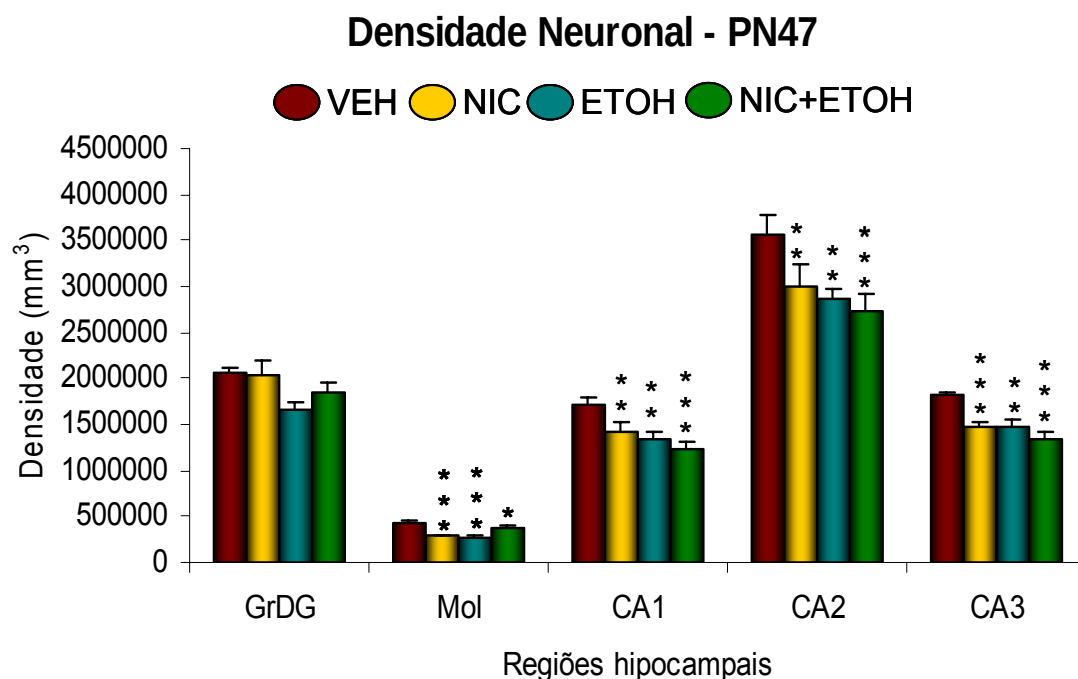


Figura 13 – Efeito do tratamento de nicotina e/ou etanol sobre a densidade neuronal nas regiões hipocámpicas dois dias após a retirada do tratamento (PN47). Valores apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo VEH; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. grupo veículo como indicado pelo FPLSD.

3.2.2 – Densidade neuronal em PN50 (Figura 14)

Em PN50, não houve diferenças entre os grupos de tratamento (não houve efeito ou interações para nenhuma região hipocampal analisada).

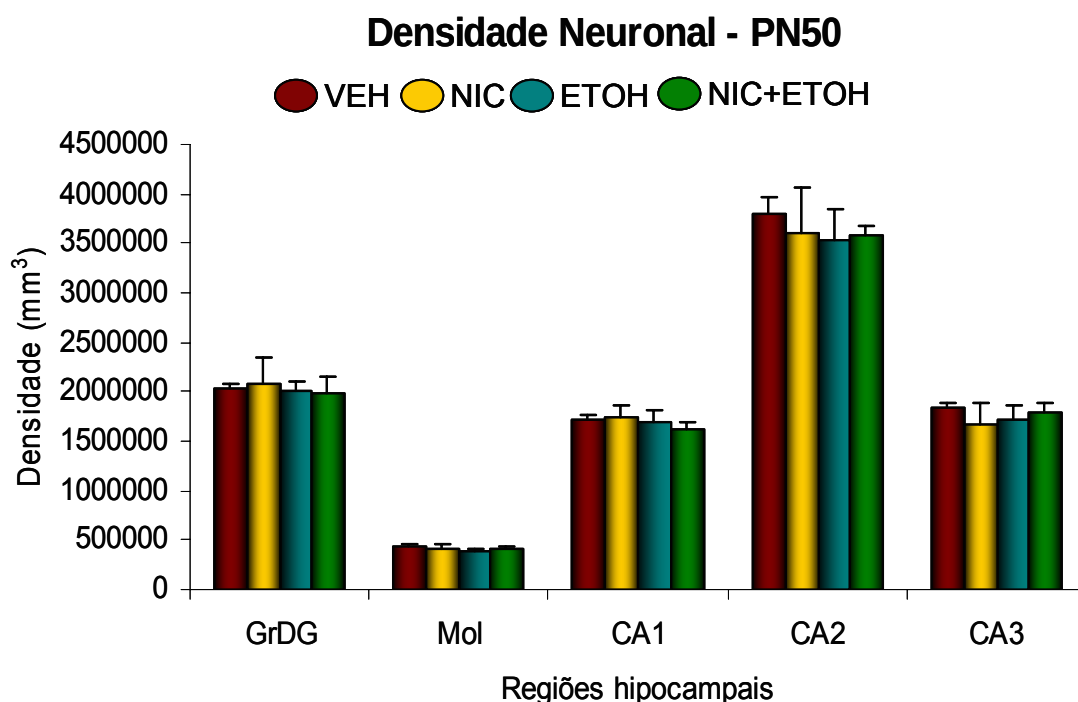


Figura 14 – Efeito do tratamento de nicotina e/ou etanol sobre a densidade neuronal cinco dias após a retirada do tratamento (PN50). Valores apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo VEH; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol.

3.3 – Densidade glial – Análise global

Semelhante aos dados para densidade de neurônios, uma ANOVA global de repetição foi feita para avaliar a densidade glial indicando um efeito significativo do TRATAMENTO ($F_{3,50}=9,3$; $P<0,001$) e interações entre: TRATAMENTO $\times$ REGIÕES HIPOCAMPAS ($F_{12,200}=2,8$; $P=0,002$), TRATAMENTO $\times$ IDADE ($F_{3,50}=5,4$; $P=0,003$), TRATAMENTO $\times$ REGIÕES HIPOCAMPAS $\times$ IDADE ($F_{12,200}=4,2$; $P<0,001$). Todos os fatores também interagiram com SEXO ($F_{12,200}=1,7$; $P=0,07$). Adicionalmente, a análise bidimensional mostrou interação entre NICOTINA $\times$ ETHANOL ($F_{1,50}=11,7$; $P=0,001$), NICOTINA $\times$ ETHANOL $\times$ REGIÕES HIPOCAMPAS ($F_{4,200}=4,9$, $P<0,001$), NICOTINA $\times$ ETHANOL $\times$ IDADE ($F_{1,50}=3,1$; $P=0,08$) e NICOTINA $\times$ ETHANOL $\times$ REGIÕES HIPOCAMPAS $\times$ IDADE ($F_{4,200}=9,0$; $P<0,001$).

Considerando as interações apresentadas acima, análises subsequentes foram realizadas separadamente para cada região hipocampal e para cada idade e os dados foram re-avaliados. O fator sexo foi mantido nas análises.

3.3.1 – Densidade glial em PN47 (Figura 15)

Em PN47, ANOVAs unidimensionais para cada região hipocampal identificaram efeito significativo do TRATAMENTO para: Mol (F 3,25=14,5; $P<0,001$); CA1 (F 3,25=7,9; $P<0,001$); CA2 (F 3,25=7,7; $P<0,001$) e CA3 (F 3,25=12,0; $P<0,001$). As análises *post-hoc* para cada região indicaram diminuição da densidade glial durante a abstinência do grupo tratado com nicotina, do grupo tratado com etanol e do grupo tratado com nicotina+etanol quando comparados com os animais do grupo VEH. Não houve efeito do tratamento para: GrDG (F 3,25=1,9; $P=0,15$). Re-analisando os dados, considerando os tratamentos Nicotina e Etanol como fatores separados, identificamos efeitos dependentes da região. ANOVAs indicaram que houve interações significativas entre NICOTINA×ETANOL para as regiões Mol (F 1,25=36,2; $P<0,001$), CA2 (F 1,25=2,9; $P=0,09$) e CA3 (F 1,25=4,5; $P=0,04$) indicando efeito menos que aditivo da abstinência de Nicotina e de Etanol. Em contrapartida, para CA1, ANOVA não mostrou interações significativas entre esses fatores o que indica efeito aditivo da nicotina e etanol.

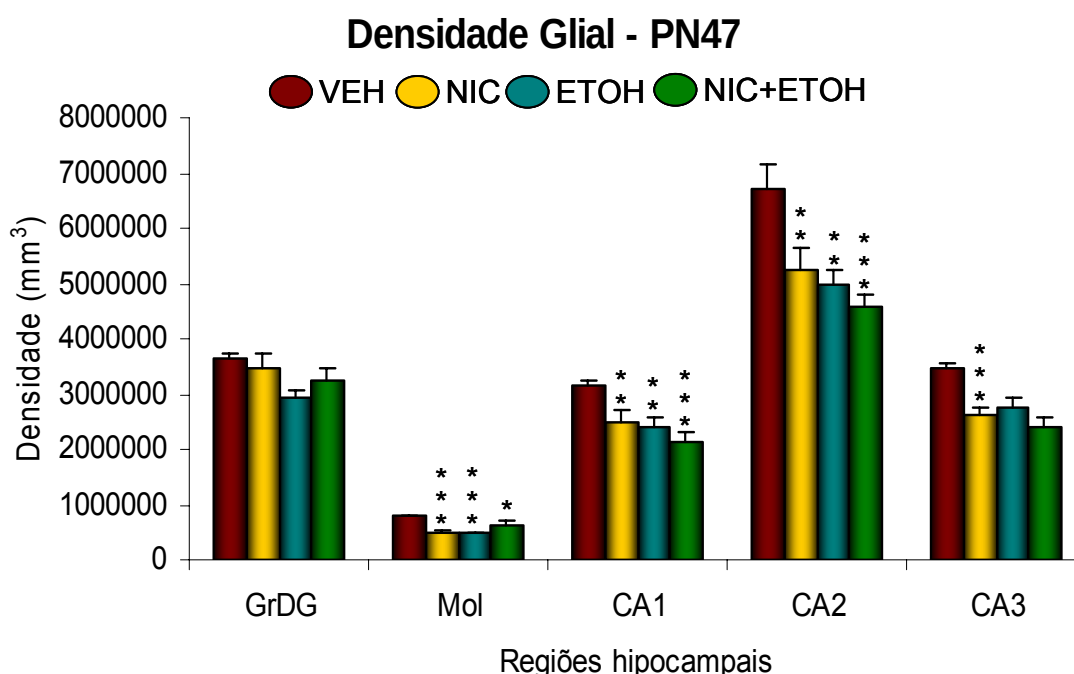


Figura 15 – Efeito do tratamento de nicotina e/ou etanol sobre a densidade glial dois dias após a retirada do tratamento (PN47). Valores apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo VEH; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol.

3.3.2 – Densidade glial em PN50 (Figura 16)

Em PN50, não houve diferenças entre os grupos de tratamento. Não houve efeito ou interações do tratamento com nenhuma região hipocampal analisada.

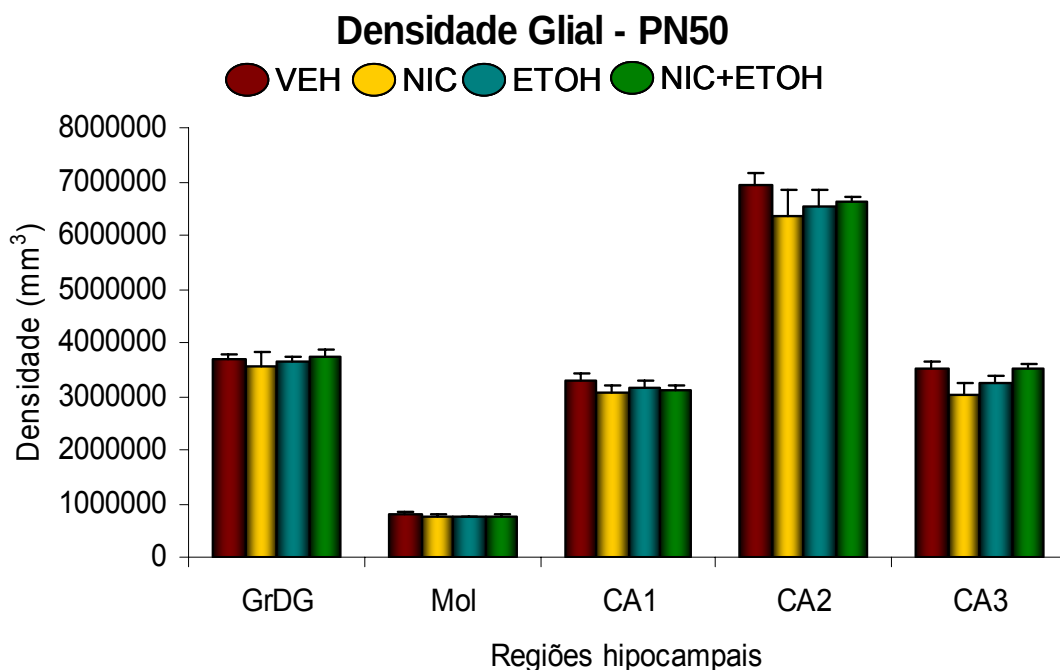


Figura 16 – Efeito do tratamento de nicotina e/ou etanol sobre a densidade glial cinco dias após a retirada do tratamento (PN50). Valores apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo VEH; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol

3.4 – Razão entre células gliais/neurônios (Tabela 3)

A razão células da glia/neurônios variou de acordo com a região hipocampal analisada ($F_{4,100}=3,7$; $P=0,008$), contudo, essa razão não foi afetada pela retirada de nicotina e/ou etanol.

Tabela 3 – Razão entre células gliais/neurônios com dois e cinco dias de abstinência

	GrDG	Mol	CA1	CA2	CA3
PN47					
VEH	1,77	1,78	1,82	1,88	1,91
NIC	1,70	1,67	1,75	1,74	1,78
ETOH	1,77	1,71	1,80	1,74	1,87
NIC+ETOH	1,76	1,70	1,75	1,67	1,80
PN50					
VEH	1,82	1,80	1,92	1,82	1,92
NIC	1,71	1,85	1,76	1,76	1,81
ETOH	1,81	1,88	1,86	1,85	1,87
NIC+ETOH	1,87	1,83	1,92	1,84	1,96

3.5 – Espessura das regiões (Figuras 17 e 18)

ANOVAs unidimensional e bidimensional indicaram que a espessura das diferentes regiões hipocâmpais analisadas não foram afetadas pela abstinência de dois dias de nenhuma das duas drogas utilizadas nesse estudo, como demonstrado pelo fato de não ter havido efeito do TRATAMENTO nem interações entre TRATAMENTO e outros fatores.

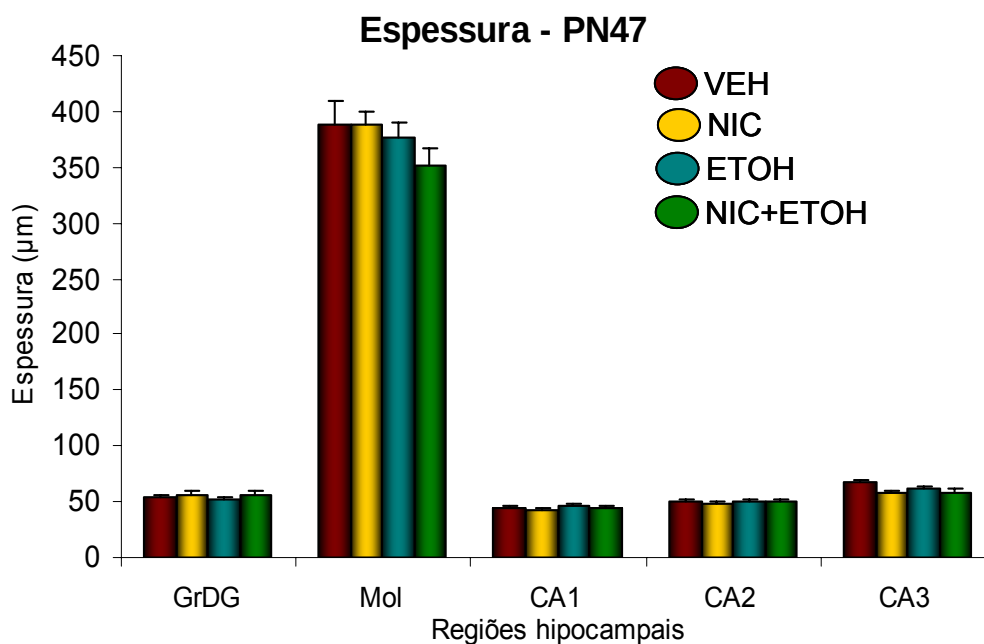


Figura 17 – Efeito do tratamento de nicotina e/ou etanol sobre a espessura dois dias após a retirada do tratamento (PN47). Não houve diferenças significativas entre os grupos. Valores são apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo VEH; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol.

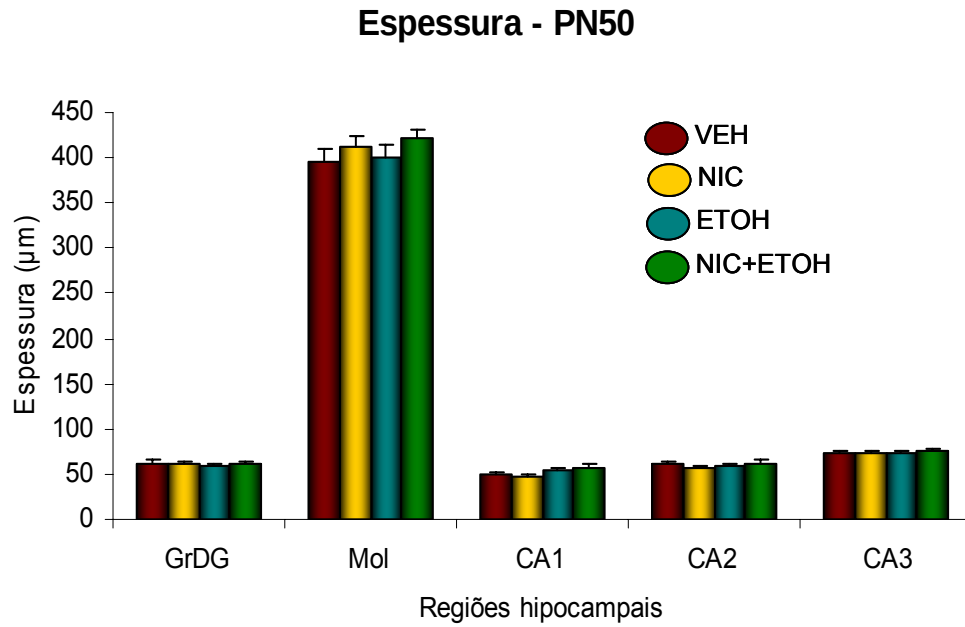


Figura 18 – Efeito do tratamento de nicotina e/ou etanol sobre a espessura cinco dias após a retirada do tratamento (PN50). Não houve diferenças significativas entre os grupos. Valores são apresentados como médias $\pm$ EPM. VEH = grupo VEH; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol.

V – DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram aumento da morte celular por apoptose durante a exposição à nicotina e ao etanol na adolescência (PN45) e dois dias após a retirada das drogas (PN47) em todas as regiões hipocampais estudadas. Inversamente, com cinco dias de retirada (PN50), ocorre redução da apoptose nas regiões hipocampais. O aumento da morte celular está associada com redução da densidade neuronal e glial durante a exposição com uma gradativa recuperação da densidade celular no período de abstinência de dois (PN47) e cinco (PN50) dias. Além disso, a exposição à nicotina quando combinada com o etanol reduz os efeitos adversos das duas drogas quando administradas separadamente mostrando que há interação entre elas durante a adolescência.

Baseado em achados recentes de que a nicotina e o álcool interagem durante a adolescência provocando alterações comportamentais (Abreu-Villaça et al., 2007 e 2008) e neuroquímicas (Ribeiro-Carvalho et al., 2008 e 2009), nossos resultados fornecem evidências de que esses efeitos estão associados às perdas celulares no cérebro adolescente. Adicionalmente, a recuperação na densidade de células descrita acima pode estar associada à recuperação funcional com a manutenção da abstinência.

1 – Considerações metodológicas

Considerando que algumas linhagens de ratos e camundongos demonstram aversão ao sabor da nicotina, camundongos da linhagem C57BL/6 foram selecionados pelo fato de animais adultos e peri adolescentes desta cepa consumirem nicotina na concentração utilizada no presente estudo (Klein et al., 2003 e 2004; Sparks e Pauly, 1999). A nicotina oral tem mostrado ser eficaz em provocar alterações comportamentais (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007 e 2008; Adriani et al., 2002 e 2004; Gaddnas et al., 2001; Manhães et al., 2008) e neuroquímicas (Gaddnas et al., 2001; Nuutinen et al., 2005; Ribeiro-Carvalho et al., 2008; Sparks e Pauly, 1999; Tammimaki et al., 2006), bem como alterações na expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica induzida por drogas de abuso (Marttila et al., 2006), nesta e em outras linhagens de camundongos.

A linhagem de camundongos C57BL/6 é conhecida por apresentar características peculiares, tais como um maior consumo voluntário de etanol (Crawley et al., 1997), o que deve ser levado em consideração nos estudos que envolvem a administração desta substância. Apesar das peculiaridades dessa linhagem, diferenças significativas entre os grupos foram observados em nosso estudo. Este fato indica claramente que há alguns aspectos fundamentais da neurobiologia desses animais que foram diferencialmente afetados pelo tratamento, justificando assim futuras investigações. Assim, estudos posteriores sobre as bases biológicas das interações entre o etanol e a nicotina são necessários e o uso de outras linhagens e espécies pode fornecer dados valiosos.

No presente estudo, uma solução de 50µg/ml de nicotina em 2% de sacarina foi oferecida *ad libitum* como única fonte de líquido, enquanto injeções i.p. de uma solução (v/v) de 2 g/Kg de etanol foram administradas em dias alternados. Este desenho experimental teve como objetivo mimetizar o padrão de consumo dessas drogas pelos adolescentes humanos. Neste sentido, a avaliação do nível de exposição à nicotina e ao etanol é de fundamental importância para a interpretação dos nossos resultados, como também, para a possibilidade de generalização com a população humana. Dados recentes do nosso laboratório mostraram que a concentração de nicotina usada na solução de beber oferecida aos nossos animais experimentais gerou níveis sanguíneos de cotinina (um metabólito da nicotina) de aproximadamente 128 ng/ml (Ribeiro-Carvalho et al., 2009) que são comparáveis aos encontrados em adolescentes fumantes (Binnie et al., 2004; Caraballo et al., 2004; Wood et al., 2004). A respeito do etanol, além das mudanças neurofisiológicas ocorridas na adolescência, outras mudanças 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). Com relação à dose de etanol usada no presente estudo, dados recentes de nosso laboratório (Ribeiro-Carvalho et al., 2009), indicaram níveis sanguíneos de etanol de aproximadamente 137 mg/dL, que correspondem a valores encontrados em adolescentes humanos após a ingestão de doses moderadas de álcool (Eckardt et al., 1998).

Interações farmacocinéticas entre nicotina e etanol poderiam explicar os efeitos menos que aditivos da exposição combinada que obtivemos no presente

estudo. Neste sentido, estudos anteriores mostram que os níveis plasmáticos de etanol estão reduzidos em animais que receberam a exposição simultânea de etanol e nicotina (Chen e Harle, 2005; Gilbertson e Barron, 2005). No entanto, esta redução só foi descrita em animais que receberam etanol por via oral, e foi demonstrado que este fato está relacionado com o atraso no esvaziamento gástrico induzido pela nicotina, levando ao aumento da metabolização do etanol pela enzima gástrica álcool desidrogenase (Oneta et al., 1998). Dados recentes do nosso laboratório mostram que níveis plasmáticos de cotinina não diferem entre camundongos expostos à nicotina e nicotina+etanol e, da mesma maneira, os níveis de etanol não são afetados pela exposição concomitante à nicotina (Ribeiro-Carvalho et al., 2009). Estudos anteriores mostraram que concentrações de etanol i.p. não são afetadas pela exposição crônica à nicotina (Parnell et al., 2006) e exposição à nicotina não afeta a taxa de eliminação do etanol (Collins et al., 1988). Portanto, é improvável que apenas interações farmacocinéticas entre nicotina e etanol possam explicar os resultados aqui encontrados sobre os efeitos da exposição combinada de nicotina e etanol na morte celular e densidade neuronal e glial no hipocampo.

O presente estudo utilizou para contagem de morte celular por apoptose a técnica de marcação pelo terminal 3'-OH do DNA pela desoxinucleotidil transferase (TUNEL). Já se sabe que essa técnica apresenta limitações para marcação do número real de células apoptóticas levando em consideração o fato de que a apoptose é um mecanismo dinâmico e que os núcleos picnóticos dessas células permanecem no organismo por aproximadamente 48 horas (Crews et al., 2000; Switzer III, 2000) sendo constantemente fagocitados pelos macrófagos. Adicionalmente, a técnica do TUNEL não nos permite identificar quais tipos celulares são afetados pela nicotina e/ou etanol: neurônios ou glia. Contudo, como discutido abaixo, nossos resultados sugerem que ambos são sensíveis aos efeitos neurotóxicos dessas drogas.

Para a identificação dos tipos celulares afetados, foram realizadas medidas de densidade neuronal e glial pelo método do Disector Óptico. Para muitos autores este método é considerado sem viés, pois a contagem não é afetada pelo tamanho, formato ou orientações das partículas a serem contadas, possuindo vantagens em relação aos métodos convencionais de quantificação celular (Gardella et al., 2003; Mandarim-de-Lacerda, 2003). Diferente do método do

TUNEL, o Disector óptico permitiu a identificação do resultado final das alterações que ocorreram ao longo do período de exposição das drogas, enquanto através das quantificações realizadas com dois e cinco dias após a retirada, identificamos o resultado final das alterações ocorridas durante a exposição e ao longo da abstinência, respectivamente. Contudo, somente com a utilização deste método, não é possível identificar se acontecimentos como morte celular e/ou alterações na taxa de neurogênese e/ou gliogênese estão ocorrendo.

Sendo assim, a combinação dessas duas técnicas – TUNEL e Disector óptico - nos permitiu identificar a morte celular, como responsável, pelo menos em parte, pela redução da densidade neuronal e glial no hipocampo dos animais expostos à nicotina e/ou etanol. Foi possível verificar também que a redução da morte celular nos animais tratados com nicotina e/ou etanol e analisados cinco dias após o tratamento contribuiu para a recuperação neuronal e glial que ocorreu durante a abstinência.

Vale à pena ressaltar o fato de que vários estudos descrevem os efeitos da nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento cerebral concentrando-se apenas sobre os efeitos provocados nos neurônios, entretanto, esta é a primeira evidência de que doses moderadas de nicotina e/ou etanol durante a adolescência provocam uma diminuição na densidade de células gliais.

Dentro deste contexto, devemos levar em consideração que as interações neurônio-glia são de importância fundamental na organização e na manutenção da arquitetura e funcionamento do sistema nervoso. Durante muito tempo, as células gliais foram consideradas apenas companheiras passivas dos neurônios, os quais realizavam funções essenciais no sistema nervoso (Gomes et al., 2003a). Nos últimos anos, diversos estudos mostraram que existem inúmeras interações existentes entre neurônios e glia no controle de processos essenciais que atuam no desenvolvimento cerebral como: neurogênese (Lim e Alvarez-Buylla, 1999), mielinização (Barres, 1997), formação de sinapses (Pfrieger e Barres, 1997) e proliferação e diferenciação celular (Anton et al., 1997; Gomes et al., 1999). Além disso, diversos fatores solúveis são secretados pelos neurônios ou pela glia, como neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento que contribuem para a manutenção da morfogênese do sistema nervoso (Gomes et al., 2003).

2 – Alterações no peso corporal e na ingesta de líquido/peso corporal

O peso corporal dos animais estudados aumentou durante o período de exposição, entretanto, este aumento não foi dependente do tratamento, e como era esperado, houve efeito do sexo devido ao fato de machos pesarem mais que fêmeas.

Com relação à proporção ingesta/peso corporal, nossos resultados demonstraram um aumento durante o período de exposição sendo esse aumento dependente do tratamento. Esse efeito pode ser explicado pelo fato do grupo veículo apresentar maiores valores de ingesta/peso comparativamente com os demais grupos (VEH>NIC; VEH>ETOH; VEH>NIC+ETOH) na maioria dos dias do tratamento. Os grupos que receberam apenas nicotina ou apenas etanol não demonstraram interações, indicando que as interações existentes no grupo que recebeu a dupla exposição refletiram um efeito aditivo da nicotina e do etanol.

Estes resultados juntamente com a ausência de diferenças entre o grupo que recebeu apenas nicotina e o grupo que recebeu a dupla exposição, assim como o fato do grupo que recebeu apenas etanol diferir do grupo veículo somente em três dias do tratamento, indicam que a exposição à nicotina proporcionou uma redução significativa na ingesta/peso, provavelmente devido a um efeito aversivo ao gosto da solução de nicotina e que as injeções de etanol tiveram pouca influência na determinação do consumo de líquido.

Apesar dessa pequena diferença de consumo entre os grupos, não houve redução do peso corporal dos animais analisados, assim, sugerimos que as alterações de ingesta/peso corporal tiveram pouca ou nenhuma influência nos resultados obtidos neste estudo.

3 – Efeitos da nicotina e/ou etanol no hipocampo

3.1 – Danos hipocampais provocados pela nicotina

Nossos resultados demonstram que o grupo nicotina apresentou aumento significativo no número de células marcadas positivamente pelo TUNEL no hipocampo durante o período de tratamento (PN45) e dois dias após o término deste (PN47). Já na abstinência de cinco dias (PN50), houve uma redução no número de células marcadas positivamente pelo TUNEL em todas as regiões

hipocampais analisadas, o que sugere um efeito compensatório ao dano provocado anteriormente.

A nicotina provoca morte celular em algumas fases do desenvolvimento embrionário humano e de outros animais (Adams et al., 2002; Hellstrom-Lindahl et al., 1998; Roy e Sabherwal, 1998; Tribollet et al., 2004). Berger e colaboradores mostraram que a nicotina é citotóxica para as células progenitoras hipocampais (Berger et al., 1998). Adicionalmente, estudos anteriores mostraram que a exposição à nicotina durante a adolescência, provoca danos celulares no hipocampo e em outras regiões cerebrais (Abreu-Villaça et al., 2003b, e 2004b). Jang e colaboradores em 2002 mostraram que a nicotina promove um aumento do número de células marcadas positivamente pelo TUNEL no giro denteado de ratos adolescentes (Jang et al., 2002a). Portanto, estes dados corroboram nossos resultados.

Já está consolidado na literatura que a nicotina, mesmo em pequenas doses, estimula os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) atuando na via mesolímbica, com a liberação de diversos neurotransmissores, dentre eles a dopamina (Lindholm et al., 2007), e que a exposição a esse fármaco durante o desenvolvimento promove efeitos mais intensos. Estudos anteriores demonstraram que exposições por curtos períodos de tempo (2 dias) e com doses que produzem níveis plasmáticos de nicotina correspondentes a fumar 2 cigarros, já causam *upregulation* de nAChRs em ratos adolescentes (Abreu-Villaça et al., 2003a). Além disso, a exposição à nicotina na adolescência promove *upregulation* dos receptores $\alpha 4\beta 2$ de modo mais robusto e persistente quando comparados com adultos (Abreu-Villaça et al., 2003^a; Doura et al., 2008; Trauth et al., 1999).

Já foi amplamente demonstrado que os nAChRs participam de diversos processos fisiológicos e patológicos incluindo o desenvolvimento neuronal, aprendizado e memória, e respostas de reforço induzidas por drogas de abuso (Gopalakrishnan et al., 1997; Levin e Simon, 1998). Estudos com ratos adultos demonstraram que o nAChR tipo $\alpha 7$ está presente em todas as regiões hipocampais, com sua maior concentração sendo observada no giro denteado (Fabian-Fine et al., 2001), e em um estudo genético com ratos machos adultos, foi demonstrado que as subunidades $\alpha 4$ e $\beta 2$ também estão amplamente distribuídas

no hipocampo, sendo mais densamente compactadas no giro denteado e na região CA1 (Wada et al., 1989).

A *upregulation* de receptores gerada durante a exposição à nicotina, persiste por alguns dias após o fim da exposição (Abreu-Villaça et al., 2003a; Doura et al., 2008; Miao et al., 1998; Ribeiro-Carvalho et al., 2009; Slotkin, 2004). Enquanto a ativação dos nAChRs exerce um papel trófico no desenvolvimento neuronal (Coronas et al., 2000; Hohmann e Berger-Sweeney, 1998; Pugh e Margiotta, 2000), uma estimulação colinérgica excessiva prejudica a replicação, diferenciação e sinaptonêgese, culminando em danos celulares (Abreu-Villaça et al., 2003b; Abrous et al., 2002; Slotkin, 2002; Slotkin et al., 2004).

Células em desenvolvimento são menos capazes de manter o equilíbrio dos íons cálcio que células maduras, portanto, os efeitos neurotóxicos da nicotina podem ser devidos à sua habilidade em aumentar o influxo de Ca^{2+} mediado pelos nAChRs, associado a uma incapacidade de tamponamento eficiente do cálcio (Para revisão: (Picciotto e Zoli, 2008), ambos contribuindo para desencadear as vias da morte celular programada. Interessantemente, o padrão temporal da *upregulation* dos nAChRs e o padrão temporal de morte celular provocada pela nicotina são parecidos, o que corrobora a hipótese descrita acima: *Upregulation* ocorre durante a exposição e é reduzida durante o curso do período de retirada (Abreu-Villaça et al., 2003a; Doura et al., 2008; Ribeiro-Carvalho et al., 2008 e 2009; Trauth et al., 1999); em paralelo, a morte celular associada à nicotina (Oliveira-da-Silva et al., 2009), ainda pode ser detectada dois dias após a exposição, mas não está mais presente cinco dias após seu término.

Morte celular provocada pela nicotina está associada com redução do número de neurônios e de glia durante a exposição (Oliveira-da-Silva et al., 2009) e no presente estudo foi mostrado que há redução de densidade neuronal e glial na abstinência de dois dias. Nossos resultados indicam que, como descrito para o etanol, aumento de morte celular desempenha um papel nesses resultados, mas existem evidências de que a exposição à nicotina diminui a replicação celular no hipocampo (Abrous et al., 2002; Scerri et al., 2006). Com cinco dias de abstinência, os mecanismos para explicar a redução do número de células apoptóticas não estão claros, entretanto, a nicotina promove uma *upregulation* da expressão de mRNA de fatores de crescimento no hipocampo de ratos no período pós-natal (Son e Winzer-Serhan, 2009), que hipoteticamente reduz a morte

celular programada (Huang e Reichardt, 2001). Se um efeito semelhante ocorrer durante o período de retirada, este pode explicar o número reduzido de células apoptóticas e, pelo menos, em parte, a recuperação das densidades neuronal e glial descritas no presente estudo.

Apesar de nossos achados indicarem que o cérebro é vulnerável à neurotoxicidade provocada pela nicotina quando administrada durante a adolescência (Abreu-Villaça et al., 2003b; Jang et al., 2002a), os efeitos são menos severos do que os descritos para exposição no período pré-natal (Para revisão: (Slotkin, 2008). Além disto, a despeito dos efeitos causados pela nicotina demonstrados acima serem potencialmente importantes para compreensão da neurotoxicidade da nicotina, eles são menos severos e região-dependente quando comparados aos efeitos provocados pela exposição a outros fármacos, inclusive o etanol. De fato, alguns estudos anteriores demonstram efeitos neurotóxicos no hipocampo devido à exposição ao etanol, mas não à nicotina (Mulholland et al., 2003; Prendergast et al., 2001; White e Swartzwelder, 2004).

3.2 – Danos hipocampais provocados pelo etanol

Estudos anteriores mostraram que a exposição ao etanol no período pré-natal provoca morte celular no sistema nervoso central (Ikonomidou et al., 2000; Olney et al., 2002) e que lesões no hipocampo durante o período neonatal produzem alterações comportamentais semelhantes às observadas em animais expostos ao etanol pré-natal como déficits de memória espacial (Berman e Hannigan, 2000). Deste modo, danos no hipocampo parecem estar associados com déficits comportamentais. O período de sensibilidade aos efeitos neurotóxicos induzidos pelo etanol se estende até a adolescência (Crews et al., 2000 e 2006). Considerando o papel do hipocampo tanto nos mecanismos da ansiedade quanto nos mecanismos de aprendizado/memória (para revisão: (Billard, 2006; Engin e Treit, 2007; Small, 2002), os efeitos ansiolíticos e os déficits de aprendizado/memória provocados pela exposição ao etanol durante a adolescência (Abreu-Villaça et al., 2007 e 2008) podem estar associados com nossos resultados de morte celular hipocampal.

O uso prolongado de etanol está associado com danos neuronal e glial no cérebro, tanto em adultos (Harper et al., 2003; Sullivan et al., 2003) quanto em fetos (Bookstein et al., 2001; Sowell et al., 2001). Porém, é incerto se esse dano

ocorre durante a presença de etanol e/ou durante a retirada, e se o etanol está associado com perda permanente de células (Crews et al., 2004; Lovinger, 1997).

Nossos resultados mostraram que o etanol promoveu um aumento substancial do número de células marcadas positivamente pelo TUNEL nas camadas GrDG, Mol, CA1, CA2 e CA3 de maneira não seletiva durante o período de tratamento, refletindo os efeitos neurotóxicos da exposição a essa droga e mostraram também que houve uma redução de densidade neuronal e glial no hipocampo de camundongos adolescentes em todas as regiões hipocampais analisadas, indicando que esses resultados podem estar correlacionados.

O aumento significativo do número de células apoptóticas no hipocampo mostrado nos nossos resultados durante a exposição de camundongos adolescentes ao etanol pode ser explicado, pelo menos parcialmente, pelo fato do etanol ser um antagonista glutamatérgico que atua em diversos tipos de receptores ionotrópicos, promovendo uma diminuição no fluxo de íons Ca^{+2} nos receptores NMDA (N-metyl-D-aspartato), associado com o decréscimo da ativação do CREB (*cAMP-Response-Element-Binding-protein*) e secundariamente por uma diminuição de BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*) ativando a cascata de morte celular programada (Crews e Nixon, 2009; Zou e Crews, 2006). É possível que o mecanismo seja mais sensível ao etanol nos roedores adolescentes do que nos adultos, o que sugere uma maior sensibilidade aos seus efeitos adversos durante este período de desenvolvimento (Pyapali et al., 1999; Swartzwelder et al., 1995).

Estudos recentes mostraram que a abstinência leva à liberação excessiva de glutamato endógeno e poliaminas (Gibson et al., 2003), que causam danos celulares. Durante períodos de abstinência, pode ocorrer ativação excitotóxica compensatória, o que aumenta significativamente os efeitos da atividade dos receptores NMDA sobre as células neurais (Gibson et al., 2003; Harper e Matsumoto, 2005), contribuindo para o dano celular. Arundine e Tymianski em 2003, mostraram que os insultos causados pela exposição ao etanol em culturas hipocampais durante a abstinência são persistentes até três dias após a retirada da droga (Arundine e Tymianski, 2003).

No presente estudo, morte celular ainda foi detectada dois dias após a exposição ao etanol; entretanto, a magnitude dos efeitos é claramente menor. Por exemplo: morte celular provocada pelo etanol durante a exposição variou de

120% a 140% dependendo da região hipocampal analisada, enquanto dois dias após a exposição, o aumento variou de 45% a 65%. Além da morte celular causada pela exposição ao etanol durante a abstinência, também houve redução das densidades neuronal e glial dois dias após a retirada do tratamento.

Com cinco dias de abstinência, os camundongos tratados apresentaram redução do número de células marcadas positivamente pelo TUNEL quando comparados aos camundongos não tratados. Não houve diferenças significativas da densidade neuronal e glial entre os grupos de tratamento indicativo de recuperação dos efeitos deletérios da exposição ao etanol. De modo geral, esses resultados sugerem que os danos celulares são reversíveis, pelo menos parcialmente, durante o curso da abstinência.

A resposta compensatória na morte celular pode ser responsável, pelo menos em parte, pela recuperação das densidades neuronal e glial que ocorre durante o curso da abstinência. Entretanto, neurogênese e gliogênese podem ter contribuído para essa recuperação. Em acordo com essa hipótese, estudos *in vitro* mostraram que a exposição crônica de células hipocâmpais ao etanol está associada com redução da replicação celular (redução da incorporação de bromodeoxiuridina) e perda de neurônios e de glia, mas alguns dias de abstinência são suficientes para que os índices celulares retornem aos níveis normais (Wilkins Jr. et al., 2006). Abstinência de etanol durante o período pós-natal (Helfer et al., 2009) e na fase adulta (He et al., 2009) provoca aumento no número de novas células geradas em regiões cerebrais como o hipocampo e o córtex cerebral.

3.3 – Danos hipocâmpais provocados pela nicotina+etanol

Nossos resultados mostraram que camundongos adolescentes que receberam o tratamento combinado de nicotina+etanol apresentaram um número reduzido de células marcadas positivamente pelo TUNEL quando comparados aos grupos que receberam apenas nicotina ou apenas etanol, em todas as regiões hipocâmpais analisadas, indicando um efeito menos que aditivo da nicotina e do etanol. De forma semelhante, dois dias após o término da exposição, os camundongos adolescentes que receberam o tratamento combinado não apresentaram aumento significativo no número de células apoptóticas na maioria das regiões hipocâmpais analisadas. Diferentemente, com

cinco dias de abstinência, houve uma diminuição do número de células apoptóticas em todas as regiões hipocâmpais quando comparamos com os animais do grupo veículo.

Nos últimos anos, alguns estudos têm mostrado que a nicotina e o etanol aumentam o número de células marcadas positivamente pelo TUNEL no giro denteado e em outras regiões de cérebros em desenvolvimento e que camundongos adolescentes que recebem tratamento combinado de nicotina e etanol apresentam redução do número de células marcadas positivamente pelo TUNEL quando comparados com os grupos que receberam apenas nicotina ou apenas etanol em várias regiões hipocâmpais (Huang et al., 2007; Jang et al., 2002a). Tizabi e colaboradores em 2005 também demonstraram que a nicotina parece inibir a neurotoxicidade induzida pelo etanol em cultura de células corticais e cerebelares (Tizabi et al., 2005).

Como discutido acima, a nicotina pode causar um aumento na concentração do íon Ca^{2+} intracelular, que deve ativar as vias de morte celular programada, preferencialmente em células em diferenciação ou em células imaturas, que não apresentam sistemas de tamponamento adequados (Berger et al., 1998, Hashimoto et al., 2001). Por outro lado, a exposição ao etanol promove uma diminuição do fluxo de Ca^{2+} que deve ativar as vias de morte celular programada levando a célula a cometer suicídio (Crews e Nixon, 2009; Zou e Crews, 2006). Assim, os efeitos opostos da nicotina e do etanol na concentração do íon Ca^{+2} podem explicar a redução dos efeitos neurotóxicos da exposição combinada.

Paradoxalmente, a exposição à nicotina reduz as consequências do desequilíbrio de Ca^{+2} supostamente pela regulação aumentada (*upregulation*) da proteína calbidina-D28k ligada ao Ca^{+2} enquanto o etanol regula para baixo (*dowregulation*) essa proteína no hipocampo (Mulholland et al., 2003). No entanto, devemos tomar cuidado com esses achados, pois esse estudo foi realizado *in vitro* e em células diferenciadas do hipocampo de ratos, onde os mecanismos de regulação iônica já se encontram maduros.

Considerando que a maturação do hipocampo de ratos adolescentes tem células em todos os estágios de desenvolvimento, é possível que os mecanismos de equilíbrio da concentração do íon Ca^{+2} estejam presentes e que o resultado final da nossa exposição é o resultado da soma de ambos os efeitos.

Apesar dos mecanismos exatos que explicam as interações nicotina+etanol ainda precisarem ser elucidadas, a nicotina parece ter um papel de neuroprotetor importante na mediação de efeitos contra outras neurotoxinas. Dentre esses efeitos neuroprotetores podemos citar a ativação do fator de crescimento fibroblástico (Belluardo et al., 2000) e inativação de canais de cálcio do tipo-L (Stevens et al., 2003). Nicotina pode prevenir morte celular de diversos insultos neurotóxicos, incluindo excitotoxicidade possivelmente pela modulação da sinalização de Ca^{2+} , que deve alterar subseqüentes respostas para esse íon (Para revisão: (Picciotto e Zoli, 2008). Assim, a nicotina pode impedir morte celular causada pela excitotoxicidade desencadeada pela retirada do etanol (Gulick e Gould, 2008).

Com relação aos achados mencionados acima, nossos resultados mostraram que os efeitos deletérios da nicotina+etanol das densidades neuronal e glial durante a exposição e durante dois dias de retirada foram significativos. Existem duas possibilidades para explicar porque a redução das densidades neuronal e glial não acompanharam a morte celular durante a exposição e com dois dias de abstinência. Primeiro: o aumento da morte celular deve ter ocorrido previamente durante a exposição e, portanto, tanto ao final da exposição quanto dois dias após seu término, as densidades neuronal e glial mostraram-se reduzidas. Segundo: tanto a nicotina quanto o etanol afetam negativamente a neurogênese e a gliogênese no hipocampo, o que deve ser parcialmente responsável pela redução das densidades detectada tanto no final do período de exposição (Oliveira-da-Silva et al., 2009) quanto após dois dias de retirada do tratamento. Essa hipótese está de acordo com estudos anteriores (Abrous et al., 2002; Crews et al., 2006; Shingo e Kito, 2005; Wilkins Jr. et al., 2006).

O tratamento combinado de nicotina+etanol na abstinência prolongada está associada com efeitos reversos das densidades neuronal e glial. Por isso, cinco dias após a retirada das drogas não houve diferenças entre os grupos tratados. Tanto para os camundongos tratados com etanol quanto para os tratados com nicotina, o número reduzido de células apoptóticas contribuiu para a reversão dos efeitos do tratamento e é possível que outros eventos como aumento de neurogênese e/ou gliogênese esteja ocorrendo. Essas evidências nos leva a crer que este seja o primeiro estudo a demonstrar que os efeitos deletérios da exposição à nicotina+etanol são revertidos durante a abstinência prolongada.

3.4 – Razão entre células gliais/neurônios

Nossos resultados mostraram que a razão glia/neurônios variou de acordo com a região hipocampal analisada, contudo, essa razão não foi afetada pela exposição à nicotina ou ao etanol administrados juntos ou separados. A razão existente entre o número de neurônios e de glia é importante por que nos dá uma noção da relação numérica de neurônios e de glia no hipocampo de camundongos C57BL/6 fornecendo um dado interessante para os estudos de proporção celular nos cérebros de mamíferos.

Outros estudos demonstraram que a razão neurônio/glia varia com a região cerebral analisada e com a espécie de animal estudada. Por exemplo: a razão neurônio/glia no neocórtex de macacos rhesus = 1,7 (Christensen et al., 2007), enquanto essa mesma razão encontrada em humanos = 0,6 (Pakkenberg et al., 2003). Em ratos, existe uma controvérsia na literatura, uma vez que Mooney e Napper em 2005 encontraram 2,0 para a razão existente entre neurônios/glia no neocórtex (Mooney e Napper, 2005), enquanto Herculano-Houzel e Lent em 2005 encontraram um valor de 0,7 para essa mesma razão (Herculano-Houzel e Lent, 2005). Apesar de modestos, nossos resultados evidenciam informações quantitativas importantes sobre a razão existente entre glia/neurônios do hipocampo de camundongos adolescentes.

3.5 – Espessuras das regiões

Durante o tratamento e nos períodos de abstinência estudados, os animais dos grupos nicotina, etanol e nicotina+etanol apresentaram valores semelhantes de espessura em todas as regiões hipocampais analisadas quando comparados aos animais VEH, mostrando que a espessura dessas regiões não foi alterada por nenhuma das duas drogas administradas juntas ou isoladas.

A redução das densidades neuronal e glial durante a exposição à nicotina e/ou etanol e durante dois dias de abstinência associadas com espessuras não alteradas sugere que houve redução no número de células neuronais e gliais nas regiões hipocampais analisadas. Adicionalmente, com cinco dias de retirada, a ausência de diferenças entre os grupos tanto nas densidades neuronal e glial quanto na espessura das regiões hipocampais sugere que com a manutenção da abstinência, há recuperação do número de neurônios e de glia no hipocampo.

4 – Considerações finais

Nossos achados apresentam evidências experimentais para as interações funcionais entre nicotina e etanol na sobrevivência de células neuronais e gliais de camundongos adolescentes. Tanto a nicotina quanto o etanol provocaram danos celulares cerebrais e a exposição combinada dessas duas drogas provocou efeitos menos severos. Assim, sugerimos que a associação entre fumar cigarros e consumir bebidas alcoólicas descrita em estudos epidemiológicos (Carmody et al., 1985; Dawson, 2000; DiFranza e Guerrera, 1990; Grant, 1998; Larsson e Engel, 2004; Meyerhoff et al., 2006; Patten et al., 1996) pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato da co-exposição provocar efeitos adversos menos severos do que a nicotina e o etanol separados.

Os danos causados durante a exposição à nicotina e/ou etanol e a recuperação dos danos celulares durante a abstinência descritos no presente estudo devem ter conseqüências funcionais, uma vez que o hipocampo desempenha um papel crucial no processo de aprendizado/memória e também no controle dos níveis de ansiedade (Billard, 2006; Engin e Treit, 2007; Small, 2002). Nesse sentido, a morte celular e os resultados da densidade celular evidenciados por nossos resultados tem como paralelo achados prévios que mostram que efeitos deletérios do etanol e da nicotina+etanol sobre o processo de aprendizado/memória durante a exposição em camundongos adolescentes não persistem durante a retirada (Abreu-Villaça et al., 2007).

De forma semelhante ao descrito no presente estudo, na análise dos níveis de ansiedade durante o período de exposição, efeitos menos que aditivos da nicotina e do etanol foram descritos: a exposição ao etanol demonstrou ter efeito ansiolítico em ratos adolescentes, enquanto a nicotina, por si só não conseguiu afetar os níveis de ansiedade. Em contrapartida, quando a nicotina foi co-administrada com o etanol, os efeitos ansiolíticos do etanol não eram identificados (Abreu-Villaça et al., 2008). Inversamente, durante o período de retirada, nossos resultados de reversão do dano não parecem ter impacto nos níveis de ansiedade, uma vez que foi demonstrado previamente que camundongos fêmeas apresentam resposta ansiogênica provocada pela abstinência de cinco dias de nicotina e/ou etanol (Abreu-Villaça et al., 2008). É possível que a recuperação numérica dos neurônios e da glia descrita nos nossos resultados não reflita uma recuperação completa na função celular. Outros estudos mostram alterações

celulares e/ou bioquímicas que não estão associadas à perda celular provocadas pela exposição à nicotina e/ou etanol (Bachtell e Ryabinin, 2001; Booker e Collins, 1997; Collins et al., 1996).

O presente estudo fornece evidência experimental de interações existentes entre nicotina e etanol durante a exposição e na abstinência dessas drogas na regulação do número celular no hipocampo de camundongos adolescentes. Estudos complementares devem ser feitos no sentido de verificar se os efeitos observados nesse estudo com camundongos adolescentes são restritos a esse período de desenvolvimento ou se eles também são encontrados em outros períodos de desenvolvimento ou na fase adulta.

VI – CONCLUSÕES

Fumar cigarro e consumir bebidas alcoólicas, em separado ou de forma concomitante, tornou-se um hábito bastante comum para os adolescentes do mundo todo, o que gera um grave problema de saúde pública. Sabendo que o cérebro adolescente continua em desenvolvimento, o conhecimento das alterações morfológicas provocadas pelo uso e abuso dessas drogas pode ser fundamental para o desenvolvimento de terapias farmacológicas com o intuito de reverter os estados de vício, prevenir recaídas e diminuir o consumo dessas drogas.

O presente estudo concluiu que:

a) Doses moderadas de nicotina e etanol provocam morte celular por apoptose no hipocampo de camundongos adolescentes comparados ao grupo VEH, refletindo na diminuição da densidade neuronal e glial, durante o período de exposição;

b) O uso de nicotina e etanol não causa alteração nos níveis de morte celular por apoptose no hipocampo. Contudo, houve diminuição da densidade de neurônios e de células gliais quando comparado ao grupo VEH;

c) Na abstinência de dois dias, os efeitos de nicotina, etanol e nicotina+etanol foram semelhantes aos obtidos durante a exposição, porém de menor magnitude.

d) Durante a abstinência de cinco dias ocorreu redução da morte celular por apoptose, refletindo em uma recuperação da densidade de neurônios e de células gliais quando comparado ao período de exposição e à abstinência de dois dias.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman,A, Dechkovskaia,A, Mehta-Simmons,H, Guan,X, Khan,W, e bou-Donia,M. Increased expression of glial fibrillary acidic protein in cerebellum and hippocampus: differential effects on neonatal brain regional acetylcholinesterase following maternal exposure to combined chlorpyrifos and nicotine. *J.Toxicol.Environ.Health A* 2003; 66: 2047-2066.
- Abreu-Villaca,Y, Medeiros,AH, Lima,CS, Faria,FP, Filgueiras,CC, e Manhaes,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, Medeiros,AH, Lima,CS, Faria,FP, Filgueiras,CC, e Manhães,AC. Combined Exposure to Nicotine and Ethanol in Adolescent Mice Differentially Affects Memory and Learning during Exposure and Withdrawal. *Behavioural Brain Research* 2007; 181: 136-146.
- Abreu-Villaca,Y, Nunes,F, do E Queiroz-Gomes, Manhaes,AC, e Filgueiras,CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 599-610.
- Abreu-Villaça,Y, Nunes,F, Queiroz-Gomes,FE, Manhães,AC, e Filgueiras,CC. Combined Exposure to Nicotine and Ethanol in Adolescent Mice Differentially Affects Anxiety Levels during Exposure, Short Term and Long Term Withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 599-610.
- Abreu-Villaça,Y, Queiroz-Gomes,FE, Dal Monte,AP, Filgueiras,CC, e 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. *Behavioral Brain Research* 2006; 167: 175-82.
- Abreu-Villaça,Y, Seidler,F, e Slotkin,TA. Does Prenatal Nicotine Exposure Sensitize the Brain to Nicotine-Induced Neurotoxicity in Adolescence? *Neuropsychopharmacology* 2004a; 29: 1440-50.
- Abreu-Villaça,Y, Seidler,FJ, e 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.* 2003a; 988: 164-172.
- Abreu-Villaça,Y, Seidler,FJ, Tate,CA, Cousins,MM, e Slotkin,TA. Prenatal Nicotine Exposure Alters the Response to Nicotine Administration in Adolescence: Effects on Cholinergic Systems during Exposure and Withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 2004b; 29: 879-890.
- Abreu-Villaça,Y, Seidler,FJ, Tate,CA, e 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.* 2003b; 979: 114-128.
- Abreu-Villaça,Y, Silva,WC, Manhaes,AC, e Schmidt,SL. The effect of corpus callosum agenesis on neocortical thickness and neuronal density of BALB/cCF mice. *Brain Res.Bull.* 2002; 58: 411-416.
- Abrous,DN, Adriani,W, Montaron,MF, Aurousseau,C, Rougon,G, Le Moal,M, e Piazza,PV. Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J.Neurosci.* 2002; 22: 3656-3662.
- Adams,CE, Broide,RS, Chen,Y, Winzer-Serhan,UH, Henderson,TA, Leslie,FM, e Freedman,R. Development of the $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptor in rat hippocampal formation. *Dev.Brain Res.* 2002; 139: 175-187.

- Adriani,W, Granstrem,O, Macri,S, Izykenova,G, Dambinova,S, e Laviola,G. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 869-878.
- Adriani,W e Laviola,G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology* 2000; 39: 334-346.
- Adriani,W, Macri,S, Pacifici,R, e Laviola,G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27: 212-224.
- Adriani,W, Spijker,S, Deroche-Gamonet,V, Laviola,G, Le Moal,M, Smit,AB, e Piazza,PV. Evidence for enhanced neurobehavioral vulnerability to nicotine during periadolescence in rats. *J.Neurosci.* 2003; 23: 4712-4716.
- Aistrup,GL, Marszalec,W, e Narahashi,T. Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol.Pharmacol.* 1999; 55: 39-49.
- Albuquerque,EX, Pereira,EF, Alkondon,M, Schrattenholz,A, e Maelicke,A. Nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal neurons: distribution on the neuronal surface and modulation of receptor activity. *J.Recept.Signal.Transduct.Res.* 1997; 17: 243-266.
- Alkondon,M e Albuquerque,EX. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus. *J.Neurophysiol.* 2001; 86: 3043-3055.
- Alkondon,M e Albuquerque,EX. A non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulates excitatory input to hippocampal CA1 interneurons. *J.Neurophysiol.* 2002; 87: 1651-1654.
- Alkondon,M, Pereira,EFR, Almeida,LEF, Randall,WR, e Albuquerque,EX. Nicotine at concentrations found in cigarette smokers activates and desensitizes nicotinic acetylcholine receptors in CA1 interneurons of rat hippocampus. *Neuropharmacology* 2000; 39: 2726-2739.
- Alkondon,M, Pereira,EFR, Cortes,WS, Maelicke,A, e Albuquerque,EX. Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur.J.Neurosci.* 1997; 9: 2734-2742.
- Allgaier,C. Ethanol sensitivity of NMDA receptors. *Neurochem.Int.* 2002; 41: 377-382.
- Alnemri,ES, Livingston,DJ, Nicholson,DW, Salvesen,G, Thornberry,NA, Wong,WW, e Yuan,J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171-
- Altman,J e 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. American Psychiatric Association. 1996.
- Amtage,F, Neugebauer,B, McIntosh,JM, Freiman,T, Zentner,J, Feuerstein,TJ, e Jackisch,R. Characterization of nicotinic receptors inducing noradrenaline release and absence of nicotinic autoreceptors in human neocortex. *Brain Res.Bull.* 2004; 62: 413-423.
- Anthony,JC e Petronis,KR. Early-onset drug use and risk of later drug problems. *Drug Alcohol Depend.* 1995; 40: 9-15.
- Anton,ES, Marchionni,MA, Lee,KF, e Rakic,P. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* 1997; 124: 3501-3510.

- Aramakis,VB e Metherrate,R. Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex. *J.Neurosci.* 1998; 18: 8485-8495.
- Armitage,AK. Effects of nicotine and tobacco smoke on blood pressure and release of catechol amines from the adrenal glands. *Br.J.Pharmacol.Chemother.* 1965; 25: 515-526.
- Arundine,M e Tymianski,M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003; 34: 325-337.
- Bachtell,RK e Ryabinin,AE. Interactive effects of nicotine and alcohol co-administration on expression of inducible transcription factors in mouse brain. *Neuroscience* 2001; 103: 941-954.
- Bailey,CH, Giustetto,M, Huang,YY, Hawkins,RD, e Kandel,ER. Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory? *Nat.Rev.Neurosci.* 2000; 1: 11-20.
- Barnes,DE e Walker,DW. Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Dev.Brain Res.* 1981; 1: 333-340.
- Barres, B. A. Neuron-glia interactions. In: *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. In: Cowan WM, Jessell TM, and Zipursky SL. (Eds.) Oxford University Press, New York, 1997, pp. 64-107.
- Batel,P, Pessione,F, Maitre,C, e Rueff,B. Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction* 1995; 90: 977-980-
- Baumrind,DA. Developmental perspective on adolescent risk taking in contemporary America. 1987; 93-125.
- Bayer,SA, Yackel,JW, e Puri,PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 1982; 216: 890-892.
- Bedi,KS e Warren,MA. The effects of undernutrition during early life on the rat optic nerve fibre number and size-frequency distribution. *J.Comp Neurol.* 1983; 219: 125-132.
- Behse,F. Morphometric studies on the human sural nerve. *Acta Neurol.Scand.Suppl* 1990; 132: 1-38.
- Belluardo,N, Mudo,G, Blum,M, e Fuxe,K. Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav.Brain Res.* 2000; 113: 21-34.
- Benes,FM. Myelination of cortical-hippocampal relays during late adolescence. *Schizophren.Bull.* 1989; 15: 585-593.
- Benowitz,NL. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med.Clin.North Am.* 1992; 76: 415-437.
- Benowitz,NL. Nicotine Addiction. *Primary Care* 1999; 26: 611-631.
- Benowitz,NL, Zevin,S, e Jacob,P, III. Suppression of nicotine intake during ad libitum cigarette smoking by high-dose transdermal nicotine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1998; 287: 958-962.
- Berger,F, Gage,FH, e Vijayaraghavan,S. Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J.Neurosci.* 1998; 18: 6871-6881.
- Bergstrom,HC, McDonald,CG, French,HT, e Smith,RF. Continuous nicotine administration produces selective, age-dependent structural alteration of pyramidal neurons from prelimbic cortex. *Synapse* 2008; 62: 31-39.

- Berman,RF e Hannigan,JH. Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. *Hippocampus* 2000; 10: 94-110.
- Billard,JM. Ageing, hippocampal synaptic activity and magnesium. *Magnes.Res.* 2006; 19: 199-215.
- Binnie,V, McHugh,S, Macpherson,L, Borland,B, Moir,K, e 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.
- Blatt,NB e Glick,GD. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg.Med.Chem.* 2001; 9: 1371-1384.
- Blomqvist,O, Ericson,M, Engel,JA, e Soderpalm,B. Accumbal dopamine overflow after ethanol: localization of the antagonizing effect of mecamylamine. *Eur.J.Pharmacol.* 1997; 334: 149-156.
- Blomqvist,O, Ericson,M, Johnson,DH, Engel,JA, e Soderpalm,B. Voluntary ethanol intake in the rat: effects of nicotinic acetylcholine receptor blockade or subchronic nicotine treatment. *Eur.J.Pharmacol.* 1996; 314: 257-67.
- Bobo,JK, Gilchrist,LD, Schilling,RF2, Noach,B, e Schinke,SP. Cigarette smoking cessation attempts by recovering alcoholics. *Addict Behav.* 1987; 12: 209-215.
- Booker,TK e Collins,AC. Long-term ethanol treatment elicits changes in nicotinic receptor binding in only a few brain regions. *Alcohol* 1997; 14: 131-140.
- Bookstein,FL, Sampson,PD, Streissguth,AP, e Connor,PD. Geometric morphometrics of corpus callosum and subcortical structures in the fetal-alcohol-affected brain. *Teratology* 2001; 64: 4-32.
- Boyle,P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer* 1997; 17: 1-60.
- Brewer,RD e Swahn,MH. Binge drinking and violence. *JAMA* 2005; 294: 616-618.
- Broide,RS, Robertson,RT, e Leslie,FM. Regulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the developing rat somatosensory cortex by thalamocortical afferents. *J.Neurosci.* 1996; 16: 2956-2971.
- Brooks, J. E. *The Mighty Leaf, Tobacco Through the Countries.* Londres, 1953.
- Brown,BS, Greene,MH, e Turner,NJ. The spread of addiction-the role of the "average addict". *Am.J.Drug Alcohol Abuse* 1976; 3: 521-528.
- Budihardjo,I, Oliver,H, Lutter,M, Luo,X, e Wang,X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1999; 15: 269-290.
- Burwell,RD, Witter,MP, e Amaral,DG. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 1995; 5: 390-408.
- Caetano,R. Alcohol-related health disparities and treatment-related epidemiological findings among whites, blacks, and Hispanics in the United States. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2003; 27: 1337-1339.
- Cameron,HA e McKay,RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J.Comp Neurol.* 2001; 435: 406-417.

- Caraballo,RS, Giovino,GA, e 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, e 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, e Connor,WE. Co-occurrent use of cigarettes, alcohol, and coffee in healthy, community-living men and women. *Health Psychol* 1985; 4: 323-35.
- Chambers,RA, Taylor,JR, e Potenza,MN. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am.J.Psychiatry* 2003; 160: 1041-1052.
- Cheeta,S, Irvine,EE, Tucci,S, Sandhu,J, e File,SE. In adolescence, female rats are more sensitive to the anxiolytic effect of nicotine than are male rats. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: 601-607.
- Chen,J e Millar,WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep.* 1998; 9: 39-46.
- Chen,K e Kandel,DB. The natural history of drug use from adolescence to the mid-thirties in a general population sample. *Am.J.Public Health* 1995; 85: 41-47-
- Chen,WJ e 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.
- Christensen,JR, Larsen,KB, Lisanby,SH, Scalia,J, Arango,V, Dwork,AJ, e Pakkenberg,B. Neocortical and hippocampal neuron and glial cell numbers in the rhesus monkey. *Anat.Rec.(Hoboken.)* 2007; 290: 330-340.
- Chugani,HT, Muller,RA, e Chugani,DC. Functional brain reorganization in children. *Brain Dev.* 1996; 18: 347-356.
- Cikala,M, Wilm,B, Hobmayer,E, Bottger,A, e David,CN. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. *Curr.Biol.* 1999; 9: 959-962.
- Clarke,PG e Oppenheim,RW. Neuron death in vertebrate development: in vitro methods. *Methods Cell Biol.* 1995; 46: 277-321.
- Clarke,PGH. Neuronal death in the development of the vertebrate nervous system. *Trends Neurosci.* 1985; 8: 345-349.
- Collins,AC, Burch,JB, de Fiebre,CM, e Marks,MJ. Tolerance to and cross tolerance between ethanol and nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 29: 365-73.
- Collins,AC, Wilkins,LH, Slobe,BS, Cao,JZ, e Bullock,AE. Long-term ethanol and nicotine treatment elicit tolerance to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 990-999.
- Colquhoun,LM e Patrick,JW. Alpha3, beta2, and beta4 form heterotrimeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *J.Neurochem.* 1997; 69: 2355-2362.
- CONAR. Conselho Nacional de Auto-Regulamentação Publicitária. 2003;
- Coronas,V, Durand,M, Chabot,JG, Jourdan,F, e Quirion,R. Acetylcholine induces neuritic outgrowth in rat primary olfactory bulb cultures. *Neuroscience* 2000; 98: 213-219.
- Cotran, R. S., Kumar, V., and Robbins, S. T. Robbins: Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro, 1996.

- 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, e Paylor,R. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 132: 107-24.
- Crews,FT, Bechara,R, Brown,LA, Guidot,DM, Mandrekar,P, Oak,S, Qin,L, Szabo,G, Wheeler,M, e Zou,J. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2006; 30: 720-730.
- Crews,FT, Braun,CJ, Hoplight,B, Switzer,Rc3, e Knapp,DJ. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcsm Clin.Exp.Res.* 2000; 24: 1712-1723.
- Crews,FT, Collins,MA, Dlugos,C, Littleton,J, Wilkins,L, Neafsey,EJ, Pentney,R, Snell,LD, Tabakoff,B, Zou,J, e Noronha,A. Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2004; 28: 350-364.
- Crews,FT e Nixon,K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol* 2009; 44: 115-127.
- Cruz Orive,LM. On the estimation of particle number. *J.Microsc.* 1980; 120: 15-27.
- Dale, P., George, J. A., David, F., Lawrence, C. K., Anthony-Samuel, L., James, O. M., and Williams, S. M. Dorsal view of the human brain. In: *Neuroscience*. 2001,
- Dani,JA e De Biasi,M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2001; 70: 439-446.
- Dani,JA, Radcliffe,KA, e Pidoplichko,VI. Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *Eur.J.Pharmacol.* 2000; 393: 31-38.
- Dawson,DA. Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend* 2000; 59: 235-49.
- De Biase,M e Salas,R. Influence of neuronal nicotinic receptors over nicotine addiction and withdrawal. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 917-929.
- DeBiasi M. Nicotinic mechanisms in the autonomic control of organ systems. *J.Neurobiol.* 2002; 53: 568-579.
- Delesse,M. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *Ann Mines* 1848; 3: 379-388.
- Diamond, A. Frontal lobe function and disfunction. In: *Guidelines for the study of brain-behavior relationships during development*. LEVIN HS, EISENBERG HM e BENTON AL Eds. (Eds.) New York: Oxford Univ. Press, 1991, pp. 339-378.
- DiFranza,JR e Guerrera,MP. Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol* 1990; 51: 130-5.
- DiFranza,JR e Lew,RA. Effect of maternal cigarette smoking on pregnancy complications and Sudden Infant Death Syndrome. *J.Fam.Pract.* 1995; 40: 385-394.
- DiFranza,JR, Rigotti,NA, McNeill,AD, Ockene,JK, Savageau,JA, St.Cyr,D, e Coleman,M. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tobacco Control* 2000; 9: 313-319.
- Doetsch,F, Garcia-Verdugo,JM, e varez-Buylla,A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; 96: 11619-11624.
- Domino,EF e Yamamoto,KI. Nicotine: effect on the sleep cycle of the cat. *Science* 1965; 150: 637-638.

- Doura,MB, Gold,AB, Keller,AB, e Perry,DC. Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res.* 2008; 1215: 40-52.
- Duchen, W. and Jacobs, J. M. Nutritional deficiencies and metabolic disorders. In: *Greenfield's Neuropathology*. A.Edward (Ed.). (Eds.) great Britain by Buttler and Tanner Ltd, London, 1997, pp. 537-578.
- Dumas,TC e Foster,TC. Late developmental changes in the ability of adenosine A1 receptors to regulate synaptic transmission in the hippocampus. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 1998; 105: 137-139.
- Dunn, A. J. Kramarcy N. R. Neurochemical responses in stress: Relationships between the hypothalamic-pituitary-adrenal and catecholamine systems. In: *Handbook of Psychopharmacology*. In: IVERSEN, LL and IVERSEN SD e SNYDER SH. (Eds.) New York: Plenum, 1984, pp. 455-515.
- Dupont,RL e Gold,MS. Withdrawal and reward: implications for detoxification and relapse prevention. 1995; 25: 663-668.
- Earnshaw,WC. Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature* 1999; 397: 387, 389-
- Earnshaw,WC, Martins,LM, e Kaufmann,SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem* 1999; 68: 383-424.
- Eckardt,MJ, File,SE, Gessa,GL, Grant,KA, Guerri,C, Hoffman,PL, Kalant,H, Koob,GF, Li,TK, e Tabakoff,B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 998-1040.
- Elgoyhen,AB, Johnson,DS, Boulter,J, Vetter,DE, e Heinemann,S. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 1994; 79: 705-715.
- Elgoyhen,AB, Vetter,DE, Katz,E, Rothlin,CV, Heinemann,SF, e Boulter,J. alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001; 98: 3501-3506.
- Elliott,BM, Faraday,MM, Phillips,JM, e Grunberg,NE. Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 77: 21-8.
- Engin,E e Treit,D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behavioural Pharmacology* 2007; 18: 365-374.
- Ericson,M, Engel,JA, e Soderpalm,B. Peripheral involvement in nicotine-induced enhancement of ethanol intake. *Alcohol* 2000; 21: 37-47.
- Evrard,SG, Duhalde-Vega,M, Tagliaferro,P, Mirochnic,S, Caltana,LR, e Brusco,A. A low chronic ethanol exposure induces morphological changes in the adolescent rat brain that are not fully recovered even after a long abstinence: an immunohistochemical study. *Exp.Neurol.* 2006; 200: 438-459.
- Fabian-Fine,R, Skehel,P, Errington,ML, Davies,HA, Sher,E, Stewart,MG, e Fine,A. Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J.Neurosci.* 2001; 21: 7993-8003.
- File,SE, Kenny,PJ, e Cheeta,S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2000; 66: 65-72.

- Forster,JL, Murray,DM, Wolfson,M, e Wagenaar,AC. Commercial availability of alcohol to young people: results of alcohol purchase attempts. *Prev.Med.* 1995; 24: 342-347.
- Franklin, K. B. J. and Paxinos, G. The mouse brain in Stereotaxic coordinates. Academic Press, 1996.
- Freisthler,B, Gruenewald,PJ, Treno,AJ, e Lee,J. Evaluating alcohol access and the alcohol environment in neighborhood areas. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2003; 27: 477-484.
- Friend,KB e Pagano,ME. Smoking initiation among nonsmokers during and following treatment for alcohol use disorders. *J.Subst.Abuse Treat.* 2004; 26: 219-224.
- Friend,KB e Pagano,ME. Smoking cessation and alcohol consumption in individuals in treatment for alcohol use disorders. *J Addict Dis* 2005; 24: 61-75.
- Gaddnas,H, Pietila,K, Piepponen,TP, e Ahtee,L. Enhanced motor activity and brain dopamine turnover in mice during long-term nicotine administration in the drinking water. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 2001; 70: 497-503.
- Galduróz,JCF, Noto,AR, e Fonseca,AM. 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. 2004;
- Gardella,D, Hatton,WJ, Rind,HB, Rosen,GD, e von Bartheld,CS. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *J.Neurosci.Methods* 2003; 124: 45-59.
- Genn,RF, Tucci,S, Edwards,JE, e File,SE. Dietary restriction and nicotine can reduce anxiety in female rats. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1257-1263.
- Gibson,DA, Harris,BR, Prendergast,MA, Hart,SR, Blanchard,JA, Holley,RC, Pedigo,NW, e Littleton,JM. Polyamines contribute to ethanol withdrawal-induced neurotoxicity in rat hippocampal slice cultures through interactions with the NMDA receptor. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2003; 27: 1099-1106.
- Giedd,JN. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2004; 1021: 77-85.
- Gilbert,DGWR. Emotion, anxiety and smoking. 1989;
- Gilbertson,RJ e Barron,S. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81: 54-64.
- Goeders,NE. A neuroendocrine role in cocaine reinforcement. *Psychoneuroendocrinology* 1997; 22: 237-259.
- Gomes,FC, Paulin,D, e Moura,N, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 1999; 32: 619-631.
- Gomes,WA, Mehler,MF, e Kessler,JA. Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev.Biol.* 2003; 255: 164-177.
- Gopalakrishnan,M, Molinari,EJ, e Sullivan,JP. Regulation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Mol.Pharmacol.* 1997; 52: 524-534.
- Gould,E, Vail,N, Wagers,M, e Gross,CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001; 98: 10910-10917.

- 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* 1998a; 10: 59-73.
- 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 & Research W o r l d* 1998b; 22: 144-147.
- Gulick,D e Gould,TJ. Varenicline ameliorates ethanol-induced deficits in learning in C57BL/6 mice. *Neurobiol.Learn.Mem.* 2008; 90: 230-236.
- Gulliver,SB, Kamholz,BW, e Helstrom,AW. Smoking Cessation and Alcohol Abstinence: What Do the Data Tell Us? *Alcohol Research & Health* 2006; 29: 208-212.
- Halappanavar,SS, Rhun,YL, Mounir,S, Martins,LM, Huot,J, Earnshaw,WC, e Shah,GM. Survival and proliferation of cells expressing caspase-uncleavable Poly(ADP-ribose) polymerase in response to death-inducing DNA damage by an alkylating agent. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 37097-37104.
- Harper,C, Dixon,G, Sheedy,D, e Garrick,T. Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the New South Wales Tissue Resource Centre. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 2003; 27: 951-961.
- Harper,C e Matsumoto,I. Ethanol and brain damage. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2005; 5: 73-78.
- Hashimoto,E, Sakaguchi,S, Shiga,M, Ikeda,N, Toki,S, e Saito,T. Epidemiological studies of tobacco smoking and dependence in Japan. *Alcohol* 2001; 24: 107-110-
- Haxby,DG. Treatment of nicotine dependence. *Am.J.Health Syst.Pharm.* 1995; 52: 265-281.
- He,J, Overstreet,DH, e Crews,FT. Abstinence from moderate alcohol self-administration alters progenitor cell proliferation and differentiation in multiple brain regions of male and female p rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2009; 33: 129-138.
- Helfer,JL, Calizo,LH, Dong,WK, Goodlett,CR, Greenough,WT, e Klintsova,AY. Binge-like postnatal alcohol exposure triggers cortical gliogenesis in adolescent rats. *J.Comp Neurol.* 2009; 514: 259-271.
- Hellstrom-Lindahl,E, Gorbounova,O, Seiger,A, Mousavi,M, e Nordberg,A. Regional distribution of nicotinic receptors during prenatal development of human brain and spinal cord. *Dev.Brain Res.* 1998; 108: 147-160.
- Henningfield,JE, Cohen,C, e Slade,JD. Is nicotine more addictive than cocaine? *Br.J.Addict.* 1991; 86: 565-569.
- Henningfield,JE, Hariharan,M, e Kozlowski,LT. Nicotine content and health risks of cigars. *JAMA* 1996; 276: 1857-1858.
- Henningfield,JE e Keenan,RM. Nicotine delivery kinetics and abuse liability. *J.Consult Clin.Psychol.* 1993; 61: 743-750.
- Herculano-Houzel,S e Lent,R. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *J.Neurosci.* 2005; 25: 2518-2521.
- Hohmann,CF e Berger-Sweeney,J. Cholinergic regulation of cortical development and plasticity: new twists to an old story. *Perspect.Dev.Neurobiol.* 1998; 5: 401-425.
- Huang,EJ e Reichardt,LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu.Rev.Neurosci.* 2001; 24: 677-736.

- Huang,LH, Shiao,NH, Hsuuw,YD, e Chan,WH. Protective effects of resveratrol on ethanol-induced apoptosis in embryonic stem cells and disruption of embryonic development in mouse blastocysts. *Toxicology* 2007; 242: 109-122.
- Hughes, J. R., Higgins, S. T., and Hatsukami, D. K. Effects of abstinence from tobacco: a critical review. *Research advances in alcohol and drug problems*. In: . In: Kozlowski LT, Annis H Cappel HD Glaser F Goodstadt M Israel Y Kalant H Sellers EM Vingilis J eds. (Eds.) New York: Plenum, 1990, pp. 318-
- Hukkanen,J, Jacob,P, III, e Benowitz,NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol.Rev.* 2005; 57: 79-115.
- Huttenlocher,PR. Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *Am.J.Ment.Defic.* 1984; 88: 488-496.
- Ikegami,Y, Goodenough,S, Inoue,Y, Dodd,PR, Wilce,PA, e Matsumoto,I. Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. *Neurosci.Lett.* 2003; 349: 201-205.
- Ikonomidou,C. Triggers of apoptosis in the immature brain. *Brain Dev.* 2009; 31: 488-492.
- Ikonomidou,C, Bittigau,P, Ishimaru,MJ, Wozniak,DF, Koch,C, Genz,K, Price,MT, Stefovsk,V, Horster,F, Tenkova,T, Dikranian,K, e Olney,JW. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 2000a; 287: 1056-1060.
- INCA. Prevalencia do tabagismo no Brasil: Dados dos inqueritos epidemiologicos em capitais brasileiras. 2004;
- Jack,CR, Jr., Sharbrough,FW, Twomey,CK, Cascino,GD, Hirschorn,KA, Marsh,WR, Zinsmeister,AR, e Scheithauer,B. Temporal lobe seizures: lateralization with MR volume measurements of the hippocampal formation. *Radiology* 1990; 175: 423-429.
- Jacobs,JM e Love,S. Qualitative and quantitative morphology of human sural nerve at different ages. *Brain* 1985; 108 (Pt 4): 897-924.
- Jakobsen,J. Axonal dwindling in early experimental diabetes. I. A study of cross sectioned nerves. *Diabetologia* 1976; 12: 539-546.
- Jang,MH, Shin,MC, Jung,SB, Lee,TH, Bahn,GH, Kwon,YK, Kim,EH, e Kim,CJ. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport* 2002a; 13: 1509-1513.
- Jang,MH, Shin,MC, Lee,TH, Kim,YP, Jung,SB, Shin,DH, Kim,H, Kim,SS, Kim,EH, e Kim,CJ. Alcohol and nicotine administration inhibits serotonin synthesis and tryptophan hydroxylase expression in dorsal and median raphe of young rats. *Neurosci.Lett.* 2002b; 329: 141-144.
- Jernigan,TL, Trauner,DA, Hesselink,JR, e Tallal,PA. Maturation of human cerebrum observed in vivo during adolescence. *Brain* 1991; 114 (Pt 5): 2037-2049.
- Jerome,HJ. The concept of dependence: Historical Reflections. *Alcohol Health and Research World* 1993; 17: 188-190.
- Jones,NE, Pieper,CF, e Robertson,LS. The effect of legal drinking age on fatal injuries of adolescents and young adults. *Am.J.Public Health* 1992; 82: 112-115.
- Joschko,MA, Dreosti,IE, e Tulsi,RS. The teratogenic effects of nicotine in vitro in rats: a light and electron microscope study. *Neurotoxicol.Teratol.* 1991; 13: 307-316.
- Kalsbeek,A, Voorn,P, Buijs,RM, Pool,CW, e Uylings,HB. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J.Comp Neurol.* 1988; 269: 58-72.

- Kandel,DB, Yamaguchi,K, e Chen,K. Stages of progression in drug involvement from adolescence to adulthood: further evidence for the gateway theory. *J.Stud.Alcohol* 1992; 53: 447-457.
- Kelly,SJ, Bonthius,DJ, e West,JR. Developmental changes in alcohol pharmacokinetics in rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1987; 11: 281-286.
- Kerr,JF, Wyllie,AH, e Currie,AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 1972; 26: 239-257.
- Kerr, J. F. R., Searle, J., Harmon, B. V., and Bishop, C. J. Apoptosis. In *Perspectives on Mammalian Cell Death*. Oxford University Press, Oxford, 1987.
- KIRK. KIRK - Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. New York, 1980.
- Kiyosawa,A, Katsurabayashi,S, Akaike,N, Pang,ZP, e Akaike,N. Nicotine facilitates glycine release in the rat spinal dorsal horn. *J.Physiol* 2001; 536: 101-110.
- Klein,LC, Stine,MM, Pfaff,DW, e 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, e Kamens,HM. Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2004; 78: 13-25.
- Komro,KA e Toomey,TL. Strategies to prevent underage drinking. *Alcohol Res.Health* 2002; 26: 5-14.
- Koob,GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol.Sci.* 1992; 13: 177-184.
- Koob,GF, Roberts,AJ, Schulteis,G, Parsons,LH, Heyser,CJ, Hyytia,P, Merlo-Pich,E, e Weiss,F. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1998; 22: 3-9.
- Lad,PJ, Shoemaker,WJ, e Leffert,HL. Developmental changes in rat liver alcohol dehydrogenase. *Dev.Biol.* 1984; 105: 526-529.
- Laranjeira,R e Hinkly,D. Evaluation of alcohol outlet density and its relation with violence. *Rev.Saude Publica* 2002; 36: 455-461.
- Larsson,A e Engel,JA. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2004; 27: 713-20.
- Laudenbach,V, Medja,F, Zoli,M, Rossi,FM, Evrard,P, Changeux,JP, e Gressens,P. Selective activation of central subtypes of the nicotinic acetylcholine receptor has opposite effects on neonatal excitotoxic brain injuries. *FASEB J.* 2002; 16: 423-425.
- Lei n.º 10.702. Lei n.º 10.702 de 14 de julho de 2003. 2003;
- Lei n.º 8.069. Lei No 8.069/1990 - **Estatuto da Criança e do Adolescente**. 1990;
- Lei nº 9.294 e artigo 63 da Lei das Contravenções Penais. Lei nº 9.294, de 15 de julho de 1996 e artigo 63 da Lei das Contravenções Penais. 1996;
- Leshner,Al. Understanding drug addiction: implications for treatment. *Hosp.Pract.(Minneap.)* 1996; 31: 47-49.
- Levin,ED e Simon,BB. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology* 1998; 138: 217-230.

- Levin, E. D. and Slotkin, T. A. Developmental neurotoxicity of nicotine. In: Handbook of Developmental Neurotoxicology. Slikker, W. and Chang, L. W. (Eds.) Academic Press, San Diego, 1998, pp. 587-615.
- Levin,ED, Wilkerson,A, Jones,JP, Christopher,NC, e Briggs,SJ. Prenatal nicotine effects on memory in rats: pharmacological and behavioral challenges. *Dev.Brain Res.* 1996; 97: 207-215.
- Lewis,PD, Patel,AJ, Béndek,G, e Balázs,R. Effect of reserpine on cell proliferation in the developing rat brain: a quantitative histological study. *Brain Res.* 1977; 129: 299-308.
- Li,X e Eisenach,JC. Nicotinic acetylcholine receptor regulation of spinal norepinephrine release. *Anesthesiology* 2002; 96: 1450-1456.
- Lim,DA e Alvarez-Buylla,A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; 96: 7526-7531.
- Lima-Landman,MT e Albuquerque,EX. Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells. *FEBS Lett.* 1989; 247: 61-67.
- Lindholm,P, Voutilainen,MH, Lauren,J, Peranen,J, Leppanen,VM, Andressoo,JO, Lindahl,M, Janhunen,S, Kalkkinen,N, Timmusk,T, Tuominen,RK, e Saarma,M. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 2007; 448: 73-77.
- Lindstrom,J, Anand,R, Gerzanich,V, Peng,X, Wang,F, e Wells,G. Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog.Brain Res.* 1996; 109: 125-137.
- Little,BB, Wilson,GN, e Jackson,G. Is there a cocaine syndrome? Dysmorphic and anthropometric assessment of infants exposed to cocaine. *Teratology* 1996; 54: 145-149.
- Liu,Q e Zhao,B. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Br.J.Pharmacol.* 2004; 141: 746-754.
- Lovinger,DM. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1997; 356: 267-282.
- Lu,L, Bao,G, Chen,H, Xia,P, Fan,X, Zhang,J, Pei,G, e Ma,L. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp.Neurol.* 2003; 183: 600-609.
- Macri,S, Adriani,W, Chiarotti,F, e 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-
- Madden,PA e Heath,AC. Shared genetic vulnerability in alcohol and cigarette use and dependence. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2002; 26: 1919-1921.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. Estereologia. In: Métodos quantitativos em morfologia. EdUERJ. (Eds.) Rio de Janeiro, 1995, pp. 72-81.
- Mandarim-de-Lacerda,CA. Stereological tools in biomedical research. *An.Acad.Bras.Cienc.* 2003; 75: 469-486.
- Manhaes,AC, Guthierrez,MC, Filgueiras,CC, e breu-Villaca,Y. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav.Brain Res.* 2008; 193: 216-224.
- Marchetti,RL, Bottino,CM, Azevedo,D, Marie,SK, e de Castro,CC. [Reliability of volumetric measures of mesial temporal structures]. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002a; 60: 420-428.

- Marcussen,BL, Goodlett,CR, Mahoney,JC, e West,JR. Developing rat Purkinje cells are more vulnerable to alcohol-induced depletion during differentiation than during neurogenesis. *Alcohol* 1994; 11: 147-156.
- Marttila,K, Raattamaa,H, e 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.
- Marubio,LM, del,MA-J, Cordero-Erausquin,M, Lena,C, Le,NN, de Kerchove,dA, Huchet,M, Damaj,MI, e Changeux,JP. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* 1999; 398: 805-810.
- McGehee,DS e Role,LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu.Rev.Physiol* 1995; 57: 521-546.
- McWilliams,JR e Lynch,G. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science* 1983; 221: 572-574.
- Meldrum,BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J.Nutr.* 2000; 130: 1007S-1015S.
- Meliska,CJ e Gilbert,DG. Hormonal and subjective effects of smoking the first five cigarettes of the day: a comparison in males and females. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1991; 40: 229-235.
- Meyerhoff,DJ, Tizabi,Y, Staley,JK, Durazzo,TC, Glass,JM, e Nixon,SJ. Smoking comorbidity in alcoholism: neurobiological and neurocognitive consequences. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 2006; 30: 253-264.
- Miao,H, Liu,C, Bishop,K, Gong,ZH, Nordberg,A, e Zhang,X. Nicotine exposure during a critical period of development leads to persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. *J.Neurochem.* 1998; 70: 752-762.
- Miki,T, Satriotomo,I, Li,HP, Matsumoto,Y, Gu,H, Yokoyama,T, Lee,KY, Bedi,KS, e Takeuchi,Y. Application of the physical disector to the central nervous system: estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus. *Anat.Sci.Int.* 2005; 80: 153-162.
- Milotova,M, Riljak,V, Jandova,K, Bortelova,J, Maresova,D, Pokorny,J, e Langmeier,M. Changes of hippocampal neurons after perinatal exposure to ethanol. *Physiol Res.* 2008a; 57: 275-282.
- Mooney,SM e Napper,RM. Early postnatal exposure to alcohol reduces the number of neurons in the occipital but not the parietal cortex of the rat. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2005; 29: 683-691.
- Moulard,B, Picard,F, le,HS, Agulhon,C, Weiland,S, Favre,I, Bertrand,S, Malafosse,A, e Bertrand,D. Ion channel variation causes epilepsies. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 2001; 36: 275-284.
- Mulholland,PJ, Harris,BR, Wilkins,LH, Self,RL, Blanchard,JA, Holley,RC, Littleton,JM, e Prendergast,MA. Opposing effects of ethanol and nicotine on hippocampal calbindin-D28k expression. *Alcohol* 2003; 31: 1-10.
- Naeff,B, Schlumpf,M, e Lichtensteiger,W. Prenatal and postnatal development of high-affinity [³H]nicotine binding sites in rat brain regions: an autoradiographic study. *Dev.Brain Res.* 1992; 68: 163-174.
- Naeye,RL e Peters,EC. Mental development of children whose mothers smoked during pregnancy. *Obstet.Gynecol.* 1984; 64: 601-7.
- Napper,RM e West,JR. Permanent neuronal cell loss in the inferior olive of adult rats exposed to alcohol during the brain growth spurt: a stereological investigation. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1995; 19: 1321-1326.

- National Institute on Drug Abuse. National Institute on Drug Abuse (NIDA) - The science of Drug Abuse & Addiction. 1998;
- Nelson,DE, Giovino,GA, Shopland,DR, Mowery,PD, Mills,SL, e Eriksen,MP. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *Am.J.Public Health* 1995; 85: 34-40.
- Nisell,M, Nomikos,GC, e Svensson,TH. Nicotine dependence, midbrain dopamine systems and psychiatric disorders. *Pharmacol.Toxicol.* 1995; 76: 157-162.
- Nuutinen,S, Ahtee,L, e 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: 83-89.
- O'Leary,KT e Leslie,FM. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptor-mediated [³H]norepinephrine release from rat cerebellum. *J.Neurochem.* 2003; 84: 952-959.
- O'Loughlin,J, Kishchuk,N, DiFranza,J, Tremblay,M, e Paradis,G. The hardest thing is the habit: a qualitative investigation of adolescent smokers' experience of nicotine dependence. *Nicotine Tobacco Res.* 2002; 4: 201-209.
- Olausson,P, Ericson,M, Lof,E, Engel,JA, e Soderpalm,B. Nicotine-induced behavioral disinhibition and ethanol preference correlate after repeated nicotine treatment. *Eur.J.Pharmacol.* 2001; 417: 117-23.
- Oliveira-da-Silva,A, Vieira,FB, Cristina-Rodrigues,F, Filgueiras,CC, Manhaes,AC, e breu-Villaca,Y. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int.J.Dev.Neurosci.* 2009; 27: 539-548.
- Olney,JW, Tenkova,T, Dikranian,K, Muglia,LJ, Jermakowicz,WJ, D'Sa,C, e Roth,KA. Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. *Neurobiol.Dis.* 2002; 9: 205-219.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. 1998;
- Oneta,CM, Simanowski,UA, Martinez,M, Allali-Hassani,A, Parés,X, Homann,N, Conradt,C, Waldherr,R, Fiehn,W, Coutelle,C, e Seitz,HK. First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric emptying. *Gut* 1998; 43: 612-9.
- Oppenheim,RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu.Rev Neurosci.* 1991; 14: 453-501.
- Osboran,GL e Butler,AC. Enduring effects of periadolescent alcohol exposure on passive avoidance performance in rats. *Physiol.Psychol.* 1983; 11: 205-208.
- Oscarson,M. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29: 91-95.
- Pakkenberg,B, Pelvig,D, Marner,L, Bundgaard,MJ, Gundersen,HJ, Nyengaard,JR, e Regeur,L. Aging and the human neocortex. *Exp.Gerontol.* 2003; 38: 95-99.
- Parnell,SE, West,JR, e Chen,WJ. Nicotine decreases blood alcohol concentrations in adult rats: a phenomenon potentially related to gastric function. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 1408-1413.
- Patten,CA, Martin,JE, e Owen,N. Can psychiatric and chemical dependency treatment units be smoke free? *J Subst Abuse Treat* 1996; 13: 107-18.
- Pawlak,R, Skrzypiec,A, Sulkowski,S, e Buczek,W. Ethanol-induced neurotoxicity is counterbalanced by increased cell proliferation in mouse dentate gyrus. *Neurosci.Lett.* 2002; 327: 83-86.

- Pechansky,F, Szobot,CM, e Scivoletto,S. Uso de álcool entre os adolescentes: conceitos, características epidemiológicas e fatores etiopatológicos. *Rev Bras Psiquiatr* 2004; 26: 14-17.
- Penland,S, Hoplight,B, Obernier,J, e Crews,FT. Effects of nicotine on ethanol dependence and brain damage. *Alcohol* 2001; 24: 45-54.
- Perkins,KA. Metabolic effects of cigarette smoking. *J.Appl.Physiol* 1992; 72: 401-409.
- Perkonigg,A, Pfister,H, Hofler,M, Frohlich,C, Zimmermann,P, Lieb,R, e Wittchen,HU. Substance use and substance use disorders in a community sample of adolescents and young adults: incidence, age effects and patterns of use. *Eur.Addict.Res.* 2006; 12: 187-196.
- Petersen, A. C., Silbereisen, R. K., and Soerenson, S. Adolescent development: A global perspective. In: *Social Problems and Social Contexts in adolescence: Perspectives Across Boundaries*. In: Hurrelmann, K. and Hamilton S. F. (Eds.) Hawthorne, NY: Aldine de Gruyter, 1996, pp. 3-37.
- Pfriegeer,FW e Barres,BA. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 1997; 277: 1684-1687.
- Piasecki,TM, Jorenby,DE, Smith,SS, Fiore,MC, e Baker,TB. Smoking withdrawal dynamics: I. Abstinence distress in lapsers and abstainers. *J Abnorm Psychol.* 2003; 112: 3-13.
- Piazza,PV, Rouge-Pont,F, Deminiere,JM, Kharoubi,M, Le,MM, e Simon,H. Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Res.* 1991; 567: 169-174.
- Picciotto,MR e Zoli,M. Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease. *Front Biosci.* 2008a; 13: 492-504.
- Pierce,JP e Gilpin,E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *Am.J.Pub.Health* 1996; 86: 253-256.
- Pinsky,I e Silva,MT. A frequency and content analysis of alcohol advertising on Brazilian television. *J.Stud.Alcohol* 1999; 60: 394-399.
- Pollock,M, Nukada,H, Allpress,S, Calder,C, e Mackinnon,M. Peripheral nerve morphometry in stroke patients. *J.Neurol.Sci.* 1984; 65: 341-352.
- Pontieri,FE, Tanda,G, Orzi,F, e DiChiara,G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 1996; 382: 255-257.
- Powell,K. Neurodevelopment: how does the teenage brain work? *Nature* 2006; 442: 865-867.
- Prendergast,MA, Harris,BR, Mayer,S, Holley,RC, Hauser,KF, e Littleton,JM. Chronic nicotine exposure reduces N-methyl-D-aspartate receptor-mediated damage in the hippocampus without altering calcium accumulation or extrusion: evidence of calbindin-D28K overexpression. *Neuroscience* 2001; 102: 75-85.
- Pugh,PC e Margiotta,JF. Nicotinic acetylcholine receptor agonists promote survival and reduce apoptosis of chick ciliary ganglion neurons. *Mol.Cell.Neurosci.* 2000; 15: 113-122.
- Pyapali,GK, Turner,DA, Wilson,WA, e Swartzwelder,HS. Age and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation. *Alcohol* 1999; 19: 107-111.
- Rakic,P, Bourgeois,JP, e Goldman-Rakic,PS. Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Prog.Brain Res.* 1994; 102: 227-243.

- Rantakallio,P e Koiranen,M. Neurological handicaps among children whose mothers smoked during pregnancy. *Prevent.Med.* 1987; 16: 597-606.
- Rhodes,MC, Seidler,FJ, Abdel-Rahman,A, Tate,CA, Nyska,A, Rincavage,HL, e Slotkin,TA. Terbutaline is a developmental neurotoxicant: effects on neuroproteins and morphology in cerebellum, hippocampus and somatosensory cortex. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2003a; submitted-
- Rhodes,MC, Seidler,FJ, Qiao,D, Tate,CA, Cousins,MM, Thillai,I, e Slotkin,TA. 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.* 2003b; 195: 203-17.
- Ribeiro-Carvalho,A, Lima,CS, Filgueiras,CC, Manhães,AC, e Abreu-Villaça,Y. Nicotine and ethanol interact during adolescence: Effects on the central cholinergic systems. *Brain Res* 2008; 1232: 48-60.
- Ribeiro-Carvalho,A, Lima,CS, Medeiros,AH, Siqueira,NR, Filgueiras,CC, Manhaes,AC, e breu-Villaca,Y. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience* 2009; 162: 1174-1186.
- Ribeiro-Carvalho,A, Manhaes,AC, breu-Villaca,Y, e Filgueiras,CC. Early callosal absence disrupts the establishment of normal neocortical structure in Swiss mice. *Int.J.Dev.Neurosci.* 2006; 24: 15-21.
- Ridker,PM, Vaughan,DE, Stampfer,MJ, Glynn,RJ, e Hennekens,CH. Association of moderate alcohol consumption and plasma concentration of endogenous tissue-type plasminogen activator. *JAMA* 1994; 272: 929-933.
- Robins, L. N. Przbeck T. R. Age of onset of drug use as a factor in drug and other disorders. In: *Etiology of Drug Abuse: implications for Prevention. NIDA Research Monograph.* In Jones CL, Battjes RL. (Eds.) 1985, pp. 178-192.
- Robles,N e Sabriá,J. Effects of moderate chronic ethanol consumption on hippocampal nicotinic receptors and associative learning. *Neurobiol Learn Mem* 2008; 89: 497-503.
- Role,LW e Berg,DK. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 1996; 16: 1077-1085.
- Romano,M, Duailibi,S, Pinsky,I, e Laranjeira,R. [Alcohol purchase survey by adolescents in two cities of State of Sao Paulo, Southeastern Brazil]. *Rev.Saude Publica* 2007; 41: 495-501.
- Room,R, Babor,T, e Rehm,J. Alcohol and public health. *Lancet* 2005; 365: 519-530.
- Rosenberg, J. Nicotina - Droga Universal. 2004.
- Ross,SA, Wong,JY, Clifford,JJ, Kinsella,A, Massalas,JS, Horne,MK, Scheffer,IE, Kola,I, Waddington,JL, Berkovic,SF, e Drago,J. Phenotypic characterization of an alpha 4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. *J.Neurosci.* 2000; 20: 6431-6441.
- Roy,TS e Sabherwal,U. Effects of gestational nicotine exposure on hippocampal morphology. *Neurotoxicol.Teratol.* 1998; 20: 465-473.
- Rusted,JM, Newhouse,PA, e Levin,ED. Nicotinic treatment for degenerative neuropsychiatric disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behav.Brain Res.* 2000; 113: 121-129.

- Saffer,MD. The classification of child and adolescent mental diagnosis in primary care: diagnostic and statistical manual for primary care (DSM-PC) child and adolescent version 4. American Academy of Pediatrics 1996;
- Salamone,FN, Zhou,M, e Auerbach,A. A re-examination of adult mouse nicotinic acetylcholine receptor channel activation kinetics. *J.Physiol* 1999; 516 (Pt 2): 315-330.
- Salin-Pascual,RJ, Moro-Lopez,ML, Gonzalez-Sanchez,H, e Blanco-Centurion,C. Changes in sleep after acute and repeated administration of nicotine in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 145: 133-138.
- Sargent,PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu.Rev.Neurosci.* 1993; 16: 403-443.
- Scerri,C, Stewart,CA, Breen,KC, e Balfour,DJ. The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 184: 540-546.
- Schmalbruch,H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat.Rec.* 1986; 215: 71-81.
- Schorling,JB, Gutgesell,M, Klas,P, Smith,D, e Keller,A. Tobacco, alcohol and other drug use among college students. *J Subst Abuse* 1994; 6: 105-115-
- Shingo,AS e Kito,S. Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons. *J.Neural Transm.* 2005; 112: 1475-1478.
- Slawecki,CJ e Ehlers,CL. Enhanced prepulse inhibition following adolescent ethanol exposure in Sprague-Dawley rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1829-36.
- Slawecki,CJ, Thomas,JD, Riley,EP, e Ehlers,CL. Neonatal nicotine exposure alters hippocampal EEG and event-related potentials (ERPs) in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2000; 65: 711-718.
- Slotkin, T. A. The impact of fetal nicotine exposure on nervous system development and its role in Sudden Infant Death Syndrome. In: *Safety and Toxicity of Nicotine*. Benowitz, N. L. (Eds.) Oxford, New York, 1998, pp. 89-97.
- Slotkin,TA. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol.Teratol.* 2002; 24: 369-384.
- Slotkin,TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004; 198: 132-151.
- Slotkin,TA. If nicotine is a developmental neurotoxicant in animal studies, dare we recommend nicotine replacement therapy in pregnant women and adolescents? *Neurotoxicol.Teratol.* 2008; 30: 1-19.
- Slotkin,TA, Cho,H, e Whitmore,WL. Effects of prenatal nicotine exposure on neuronal development: selective actions on central and peripheral catecholaminergic pathways. *Brain Res.Bull.* 1987; 18: 601-611.
- Slotkin,TA, Cousins,MM, e Seidler,FJ. Administration of nicotine to adolescent rats evokes regionally selective upregulation of CNS alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* 2004; 1030: 159-163.
- Slotkin,TA e Seidler,FJ. Nicotine exposure in adolescence alters the response of serotonin systems to nicotine administered subsequently in adulthood. *Dev.Neurosci.* 2009; 31: 58-70.

- Small,SA. The longitudinal axis of the hippocampal formation: its anatomy, circuitry, and role in cognitive function. *Rev.Neurosci.* 2002; 13: 183-194.
- Smith,BR, Horan,JT, Gaskin,S, e Amit,Z. Exposure to nicotine enhances acquisition of ethanol drinking by laboratory rats in a limited access paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 142: 408-412.
- Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. *Statistical Methods.* Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1967.
- Soderpalm,B, Ericson,M, Olausson,P, Blomqvist,O, e Engel,JA. Nicotinic mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol. *Behav.Brain Res.* 2000; 113: 85-96.
- Son,JH e Winzer-Serhan,UH. Chronic neonatal nicotine exposure increases mRNA expression of neurotrophic factors in the postnatal rat hippocampus. *Brain Res.* 2009a; 1278: 1-14.
- Sowell,ER, Thompson,PM, Mattson,SN, Tessner,KD, Jernigan,TL, Riley,EP, e Toga,AW. Voxel-based morphometric analyses of the brain in children and adolescents prenatally exposed to alcohol. *Neuroreport* 2001a; 12: 515-523.
- Sowell,ER, Thompson,PM, Tessner,KD, e Toga,AW. Mapping continued brain growth and gray matter density reduction in dorsal frontal cortex: Inverse relationships during postadolescent brain maturation. *J.Neurosci.* 2001b; 21: 8819-8829.
- Sparks,JA e Pauly,JR. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57B1/6 mice. *Psychopharmacology* 1999; 141: 145-153.
- Spear,LP. 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.
- Spear,LP e Brake,SC. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev.Psychobiol.* 1983; 16: 83-109.
- Sterio,DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J.Microsc.* 1984; 134: 127-136.
- Stevens,TR, Krueger,SR, Fitzsimonds,RM, e Picciotto,MR. Neuroprotection by nicotine in mouse primary cortical cultures involves activation of calcineurin and L-type calcium channel inactivation. *J.Neurosci.* 2003; 23: 10093-10099.
- Stolerman,IP. Inter-species consistency in the behavioural pharmacology of nicotine dependence. *Behav.Pharmacol.* 1999; 10: 559-580.
- Sullivan,R, Penfold,P, e Pow,DV. Neuronal migration and glial remodeling in degenerating retinas of aged rats and in nonneovascular AMD. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2003; 44: 856-865.
- Swann,JW, Pierson,MG, Smith,KL, e Lee,CL. Developmental neuroplasticity: roles in early life seizures and chronic epilepsy. *Adv.Neurol.* 1999; 79: 203-216.
- Swartzwelder,HS, Wilson,WA, e Tayyeb,MI. Age-dependent inhibition of long-term potentiation by ethanol in immature versus mature hippocampus. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1995; 19: 1480-1485.
- Switzer,RC, III. Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. *Toxicol.Pathol.* 2000; 28: 70-83.

- Taioli,E e Wynder,EL. Effect of the age at which smoking begins on frequency of smoking in adulthood. *N.Engl.J.Med.* 1991; 325: 968-969.
- Tammimaki,A, Pietila,K, Raattamaa,H, e Ahtee,L. Effect of quinpirole on striatal dopamine release and locomotor activity in nicotine-treated mice. *Eur J Pharmacol* 2006; 531: 118-125.
- Tassonyi,E, Charpentier,E, Muller,D, Dumont,L, e Bertrand,D. The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Res.Bull.* 2002; 57: 133-150.
- Thompson, C. B. Apoptosis. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.
- Thornberry,NA, Rano,TA, Peterson,EP, Rasper,DM, Timkey,T, Garcia-Calvo,M, Houtzager,VM, Nordstrom,PA, Roy,S, Vaillancourt,JP, Chapman,KT, e Nicholson,DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 17907-17911.
- Tizabi,Y, Al-Namaeh,M, Manaye,KF, e Taylor,RE. Protective effects of nicotine on ethanol-induced toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Neurotox Res* 2003; 5: 315-321.
- Tizabi,Y, Manaye,KF, Smoot,DT, e Taylor,RE. Nicotine inhibits ethanol-induced toxicity in cultured cerebral cortical cells. *Neurotox Res.* 2004; 6: 311-6.
- Tizabi,Y, Manaye,KF, e Taylor,RE. Nicotine blocks ethanol-induced apoptosis in primary cultures of rat cerebral cortical and cerebellar granule cells. *Neurotox Res.* 2005; 7: 319-22.
- Toomey,TL e Wagenaar,AC. Environmental policies to reduce college drinking: options and research findings. *J.Stud.Alcohol Suppl* 2002; 193-205.
- Torabi,MR, Bailey,WJ, e Majd-Jabbari,M. Cigarette smoking as a predictor of alcohol and other drug use by children and adolescents: Evidence of the 'Gateway Drug Effect'. *J Sch Health* 1993; 63: 302-306-
- Trauth,JA, McCook,EC, Seidler,FJ, e Slotkin,TA. Modeling adolescent nicotine exposure: effects on cholinergic systems in rat brain regions. *Brain Res.* 2000a; 873: 18-25.
- Trauth,JA, Seidler,FJ, McCook,EC, e Slotkin,TA. Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions. *Brain Res.* 1999; 851: 9-19.
- Trauth,JA, Seidler,FJ, e Slotkin,TA. Persistent and delayed behavioral changes after nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res.* 2000b; 880: 167-172.
- Tribollet,E, Bertrand,D, Marguerat,A, e Raggenbass,M. Comparative distribution of nicotinic receptor subtypes during development, adulthood and aging: an autoradiographic study in the rat brain. *Neuroscience* 2004; 124: 405-420.
- Tsai,G e Coyle,JT. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu.Rev.Med.* 1998; 49: 173-184.
- US Department of Health and Human Services. The health consequences of smoking: nicotine addiction. Office on smoking and health, US Government Printing Office, Maryland, Washington DC, 1988.
- Uysal,N, Tugyan,K, Kayatekin,BM, Acikgoz,O, Bagriyanik,HA, Gonenc,S, Ozdemir,D, Aksu,I, Topcu,A, e Semin,I. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci.Lett.* 2005; 383: 241-245.

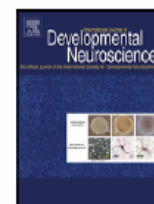
- Van Eden, C. G. Kros J. M. Uylings H. B. M. The development of the rat prefrontal cortex: Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. In: Progress in Brain Research: The Prefrontal cortex: Its Structure, Function and Pathology. In: UYLINGS HBM, VAN EDEN CG, DE BRUN JPC, CORNER MA and FEENSTRA MGP, New York: Elsevier Science, 1990, pp. 169-183.
- Van Praag H., Kempermann,G, e Gage,FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat.Neurosci.* 1999; 2: 266-270.
- Vaux,DL e Korsmeyer,SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245-254.
- Vengeliene,V, Bilbao,A, Molander,A, e Spanagel,R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br.J.Pharmacol.* 2008; 154: 299-315.
- Viala-Artigues, J. and Mechetti, C. Histoire de l'alcool archéologie. In: 2003,
- Vigié, M. M. L' herb à Nicot. Paris, 1980.
- von Bartheld C. Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histol.Histopathol.* 2002; 17: 639-648.
- Wada,E, Wada,K, Boulter,J, Deneris,E, Heinemann,S, Patrick,J, e Swanson,LW. Distribution of alpha2, alpha3, alpha4, and beta2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J.Comp.Neurol.* 1989; 284: 314-335.
- Wagenaar,AC, Finnegan,JR, Wolfson,M, Anstine,PS, Williams,CL, e Perry,CL. Where and how adolescents obtain alcoholic beverages. *Public Health Rep.* 1993; 108: 459-464.
- Wagenaar,AC, Toomey,TL, Murray,DM, Short,BJ, Wolfson,M, e Jones-Webb,R. Sources of alcohol for underage drinkers. *J.Stud.Alcohol* 1996; 57: 325-333.
- Wakschlag,LS, Lahey,BB, Loeber,R, Green,SM, Gordon,RA, e Leventhal,BL. Maternal smoking during pregnancy and the risk of conduct disorder in boys. *Arch.Gen.Psychiat.* 1997; 54: 670-676.
- West,M, LaBella,FS, Havlicek,V, e Parkinson,D. Cerebral concussion in rats rapidly induces hypothalamic-specific effects on opiate and cholinergic receptors. *Brain Res.* 1981; 225: 271-277.
- West,RJ, Hajek,P, e Belcher,M. Severity of withdrawal symptoms as a predictor of outcome of an attempt to quit smoking. *Psychol Med.* 1989; 19: 981-985.
- White,AM e Swartzwelder,HS. Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1021: 206-20.
- WHO. WHO Atlas maps global tobacco epidemic. *Cent.Eur.J.Public Health* 2003; 11: 106-
- WHO. Global Status Report on Alcohol, World Health Organization - Department of Mental Health and Substance Abuse. 2004;
- Wickholm,S, Galanti,MR, Soder,B, e Gilljam,H. Cigarette smoking, snuff use and alcohol drinking: coexisting risk behaviours for oral health in young males. *Community Dent.Oral Epidemiol.* 2003; 31: 269-274.
- Wilkins,LH, Jr., Prendergast,MA, Blanchard,J, Holley,RC, Chambers,ER, e Littleton,JM. Potential value of changes in cell markers in organotypic hippocampal cultures associated with chronic EtOH exposure and withdrawal: comparison with NMDA-induced changes. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2006; 30: 1768-1780.

- Wolfson,M, Toomey,TL, Murray,DM, Forster,JL, Short,BJ, e Wagenaar,AC. Alcohol outlet policies and practices concerning sales to underage people. *Addiction* 1996; 91: 589-602.
- Wonnacott,S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 92-8.
- Wonnacott,S, Sidhpura,N, e Balfour,DJ. Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2005; 5: 53-59.
- Wood,T, Wewers,ME, Groner,J, e Ahijevych,K. Smoke constituent exposure and smoking topography of adolescent daily cigarette smokers. *Nicotine Tob Res* 2004; 6: 853-62.
- www.ambev.com.br. Website da Companhia Brasileira de Bebidas – AMBEV. 2009.
- www.souzacruz.com.br. Website da Souza Cruz do Brasil. 2009.
- Wyllie,AH, Kerr,JF, e Currie,AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.* 1980; 68: 251-306.
- Xiao,C, Yang,KC, Zhou,CY, Jin,GZ, Wu,J, e Ye,JH. Nicotine modulates GABAergic transmission to dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta. *Acta Pharmacol.Sin.* 2009; 30: 851-858.
- Xu,W, Gelber,S, Orr-Urtreger,A, Armstrong,D, Lewis,RA, Ou,CN, Patrick,J, Role,L, De,BM, e Beaudet,AL. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999a; 96: 5746-5751.
- Xu,W, Orr-Urtreger,A, Nigro,F, Gelber,S, Sutcliffe,CB, Armstrong,D, Patrick,JW, Role,LW, Beaudet,AL, e De,BM. Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the beta2 and the beta4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J.Neurosci.* 1999b; 19: 9298-9305.
- Yanai,J, Pick,CG, Rogel-Fuchs,Y, e Zahalka,EA. Alterations in hippocampal cholinergic receptors and hippocampal behaviors after early exposure to nicotine. *Brain Res.Bull.* 1992; 29: 363-368.
- Yang,XH e Buccafusco,JJ. Comparison of the ability of direct- and indirect-acting nicotinic agonists to induce nicotinic receptor up-regulation in rat cerebral cortex. *Drug Develop.Res.* 1994; 31: 95-101.
- Zahalka,EA, Seidler,FJ, Lappi,SE, McCook,EC, Yanai,J, e Slotkin,TA. Deficits in development of central cholinergic pathways caused by fetal nicotine exposure: differential effects on choline acetyltransferase activity and [³H]hemicholinium-3 binding. *Neurotoxicol.Teratol.* 1992; 14: 375-382.
- Zecevic,N, Bourgeois,JP, e 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.
- Zimmerman,EF, Scott,WJ, Jr., e Collins,MD. Ethanol-induced limb defects in mice: effect of strain and Ro15-4513. *Teratology* 1990; 41: 453-462.
- Zoli,M, Le,NN, Hill,JA, Jr., e Changeux,JP. Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J.Neurosci.* 1995; 15: 1912-1939.
- Zou,J e Crews,F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol.Neurobiol.* 2006; 26: 385-405.

ANEXO

ARTIGO 1 – Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência no final do período de tratamento (PN45)

ARTIGO 2 – Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a abstinência dois (PN47) e cinco dias (PN50) após a retirada do tratamento



Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice

Andreia Oliveira-da-Silva, Fernanda B. Vieira, Fabiana Cristina-Rodrigues, Cláudio C. Filgueiras, Alex C. Manhães, Yael Abreu-Villaça*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2009

Received in revised form 3 June 2009

Accepted 23 June 2009

Keywords:

Adolescence

Tobacco

Alcohol

TUNEL

Neuronal density

Glial density

Apoptosis

ABSTRACT

It has been recently shown that nicotine and ethanol interact during adolescence affecting memory/learning and anxiety levels. Considering the role of the hippocampus in both anxiety and memory/learning, we investigated whether adolescent nicotine and/or ethanol administration elicit apoptotic cell death and whether this results in neuronal and/or glial density alterations in the following regions of the hippocampus: granular layer of the dentate gyrus (GrDG), molecular layer (Mol), CA1, CA2 and CA3. From the 30th to the 45th postnatal day, C57BL/6 male and female mice were exposed to nicotine free base (NIC) and/or ethanol (ETOH). Four groups were analyzed: (1) concomitant NIC (50 µg/ml in 2% saccharin to drink) and ETOH (25%, 2 g/kg i.p. injected every other day) exposure; (2) NIC exposure; (3) ETOH exposure; (4) vehicle. We evaluated cell degeneration (TUNEL assay), neuronal and glial densities (optical disector) and region thicknesses at the end of the period of exposure. Our results demonstrate that ETOH elicited an increase in TUNEL-positive cells relative to the vehicle group in all hippocampal regions. NIC elicited less severe region-dependent effects: the number of TUNEL-positive cells was significantly increased in the Mol and CA1 when compared to the vehicle group. These results were paralleled by reductions in neuronal and glial cells densities, which indicate that both cell types are sensitive to the neurotoxic effects of these drugs. There were no effects on region thicknesses. On the other hand, concomitant NIC and ETOH reduced the adverse effects of the drugs when administered separately. This ability of nicotine and ethanol co-exposure to lessen the adverse effects of nicotine and ethanol may contribute to adolescents co-use and co-abuse of tobacco and alcoholic beverages.

© 2009 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

It is well established that nicotine and ethanol are neuroteratogens. Nicotine and ethanol use and abuse damage brain cells altering cell differentiation, thus affecting synaptic maturation and cell signaling in the developing brain (Levin and Slotkin, 1998; Goodlett et al., 2005). There is strong evidence that both nicotine and ethanol trigger apoptotic neurodegeneration during the perinatal brain development of rodents (Berger et al., 1998; Ikonomidou et al., 2000; Milotová et al., 2008; Olney et al., 2002). Brain development continues into adolescence (for review: Giedd, 2008) and many of the mechanisms by which nicotine and ethanol adversely affect the fetus may still operate in the adolescent brain

(Crews et al., 2006; Slotkin, 2008; Tizabi et al., 2003). It has been demonstrated that adolescent nicotine (Abreu-Villaça et al., 2003b) and ethanol (Pascual et al., 2007) exposures cause brain cell damage and cell death.

Concurrent use and abuse of tobacco and ethanol are well documented. Smokers consume twice as much alcohol as do non-smokers, and alcoholics who smoke consume more cigarettes than do non-alcoholic smokers (Carmody et al., 1985; Dawson, 2000; DiFranza and Guerrera, 1990; Larsson and Engel, 2004; Meyerhoff et al., 2006; Patten et al., 1996). Co-use and abuse of tobacco and alcoholic beverages prevail across ages, however, studies of psychoactive substance use demonstrate a strong correlation between onset of tobacco consumption at an early age and alcohol addiction (DiFranza and Guerrera, 1990; Grant, 1998). In spite of the fact that the amount of information regarding the effects of nicotine and ethanol on brain development and function has been steadily growing, there have been relatively few animal studies on the basic neurobiology of the combined nicotine and ethanol exposure, particularly during adolescence, the period when both

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; FPLSD, Fisher's protected least significant difference; GrDG, granular layer of the dentate gyrus; Mol, molecular layer; PN, postnatal day; rANOVA, repeated-measures analysis of variance; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) to 3'-OH ends of DNA.

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2587 6295; fax: +55 21 2587 6129.

E-mail addresses: yael_a_v@yahoo.com.br, yael_a_v@pq.cnpq.br (Y. Abreu-Villaça).

smoking and drinking most frequently begin (National Institute on Drug Abuse, 1998; Nelson et al., 1995; Spear, 2000). In this regard, recent studies from our group provide experimental evidence for functional interactions between nicotine and ethanol in the regulation of anxiety and memory/learning during adolescence (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008). Considering the role of the hippocampus in both anxiety and memory/learning (for review: Billard, 2006; Engin and Treit, 2007; Small, 2002), behavioral effects of nicotine + ethanol support the assumption that the hippocampus is a site at which these drugs interact. In this regard, previous studies have shown that the hippocampus is a target for both adolescent nicotine and ethanol neurochemical and cytotoxic effects (Abreu-Villaça et al., 2003a; Jang et al., 2002; White and Swartzwelder, 2004), however, there are scant studies investigating the effects of the combined exposure in the hippocampus of adolescent rodents.

In the present study, we investigated whether adolescent nicotine and/or ethanol administration elicit cell degeneration and whether this results in neuronal and/or glial density alterations in the hippocampus. Regular smokers tend to smoke intermittently in order to maintain blood levels of nicotine above a minimum effective concentration during their active period. Therefore, in keeping with earlier experimental designs (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007, 2008), 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. In light of the unique behavioral sensitization due to nicotine and ethanol exposure during adolescence (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008), exposure began on postnatal day (PN) 30, which, based on brain development, onset of puberty, and patterns of drug reactivity, represents the early adolescent stage in the rodent, and extended up to PN45, still well within adolescence (Spear, 2000). At the end of the period of exposure we evaluated hippocampus cell degeneration with the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay, which visualizes DNA degradation. Neuronal and glial densities were evaluated with the optical disector method.

1. Experimental procedure

1.1. Animal treatment

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 (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007, 2008; Klein et al., 2003, 2004; Ribeiro-Carvalho et al., 2008; Sparks and Pauly, 1999). All mice were bred and maintained in our laboratory. Animals were derived from a C57BL/6 colony maintained at the Universidade Estadual de Campinas (São Paulo, Brazil) for over 70 generations. The animals were kept in a temperature-controlled room on a 12 h light/dark cycle (lights on at 2:00 am). Access to food and water was *ad lib*. On the first postnatal day (PN1), litters were culled to a maximum of 8 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 29 litters (46 females and 38 males) were individually housed. Single housing may reduce neurogenesis and synaptic plasticity (Lu et al., 2003), 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, 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 prepubertal periods (Spear, 2000). During this period, (–)-nicotine freebase (50 mg/ml) (Sigma, St Louis, MO) in 2% saccharin or 2% saccharin only was administered in the drinking water (the sole source of fluid) in order to mimic continuous nicotine consumption; while 25% ethanol (2 g/kg) solution (v/v) in saline or saline only was injected (i.p.) every other day in order to mimic cyclical patterns of alcohol consumption. This experimental design implicated that during the period of adolescent exposure, every 48 h, mice presented a period of ethanol

intoxication followed by withdrawal. Accordingly, male and female mice were distributed into four treatment groups: 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.

1.2. Tissue preparation

Studies were conducted at the end of the drug administration period (PN45). Twenty-one females and 17 males (from 21 litters) were deeply anesthetized and transcardially perfused with saline (0.9% NaCl–3 min), followed by a solution of paraformaldehyde 4% and sucrose 20% for cryoprotection (5 min). The skin was removed and the heads were postfixed overnight by immersion in a solution of paraformaldehyde 4% and sucrose 30%. The brains were then removed from the skulls with the aid of a dissection microscope, placed in a chilled slicing box, embedded in Optical Cut Temperature/Tissue-Tek (Sakura Finetek Inc. Torrance, CA) and frozen in liquid nitrogen. Each brain was sectioned coronally at 25 μ m using a SLEE/MEV cryostat (SLEE, Mainz–Germany) (temperature within the chamber –20 °C). Two in five sections were thaw-mounted onto gelatinized glass slides. Each first collected section was stained with cresyl violet (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) by the Nissl method and used to quantify neuronal and glial density. Each second-collected section was used to identify programmed cell death by the TUNEL staining method. Quantitative analyses were performed in the Granular layer of the dentate gyrus (GrDG), in the molecular layer (Mol) and in CA1, CA2 and CA3 regions of hippocampus of adolescent mice.

1.3. Apoptotic cell death

For visualization of apoptosis-mediated cell degeneration, TUNEL assay was performed using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. Briefly, endogenous peroxidase was inactivated by 3% H₂O₂ for 10 min at room temperature. Sections were rinsed with PBS (3 $\times$ 5 min), permeabilized with Triton X-100 in 0.5% sodium citrate pH 7.4 for 15 min at room temperature and rinsed with PBS again (3 $\times$ 5 min). Sections were then incubated with TUNEL reaction mixture (1:9) for 60 min at 37 °C and rinsed with PBS (3 $\times$ 5 min). Further incubation with peroxidase-conjugated antibody (1:2) was performed for 30 min at 37 °C, followed by PBS rinses. Sections were coverslipped using *Entellan neu* (Merck Darmstadt, Germany) and examined under the light microscope (Olympus BX40). Apoptotic, TUNEL-positive cells (brown-stained) were quantified in three equidistant hippocampal sections of each mouse.

According to Franklin and Paxinos (1997), the hippocampus extends from Bregma coordinates –0.94 to –4.04 mm. In the present study, the anteroposterior extents of the hippocampal regions to be quantified were selected from within the interval between the Bregma point –2.30 and –3.52 mm (Franklin and Paxinos, 1997), corresponding to approximately 40% of its full extent. In order to use an easily identifiable landmark to begin quantification, we chose to begin the analyses after the end of the medial habenular nucleus (Bregma –2.30 mm). We also decided to go backward only as far as both CA1 and CA3 fields were easily identifiable (Bregma –3.52 mm). To warrant the correct collection of the brain sections, we began sectioning the brain more rostrally (approximately at Bregma –0.58 mm) and finished sectioning more caudally (approximately at Bregma –5.20 mm). As we approached the Bregma coordinates used for quantification, the sections were collected. The mediolateral locations of the analyzed regions were identified based on cytoarchitectural criteria: the GrDG is a C-shaped structure composed of granule cells, medially located in the dentate gyrus. The Mol is a low density layer external to the GrDG. The CA1, CA2 and CA3 regions are located in the Ammon's horn. The CA1 is dorsally located in the horn. CA3 is ventral. CA2 consists of a narrow field of cells located between the CA1 and CA3 regions (Amaral et al., 1995; Kandel et al., 2000; Miki et al., 2005). In each section, a grid (in the eyepiece) composed of 20 μ m $\times$ 20 μ m squares was positioned over each hippocampal region (magnification, 400-fold) and apoptotic cells were counted within the frames. The number of squares within which apoptotic cells were counted varied according to the particular morphology of each hippocampal region. As a result, the final areas to be quantified were: GrDG, 16,000 μ m²; Mol, 40,000 μ m²; CA1, 8000 μ m²; CA2, 4000 μ m²; CA3, 12,000 μ m².

1.4. Neuronal and glial densities

The neuronal and glial densities were estimated using the optical disector method (Sterio, 1984) in Nissl-stained sections adjacent to those used to quantify TUNEL-positive cells. This method is considered an unbiased and efficient cell counting method by several authors (Gardella et al., 2003; Mandarin-de-Lacerda, 2003). Initially, two parallel planes (look-up and look-down planes), 3 μ m distant (z-axis) from each other, were selected with the aid of an Olympus BX40 microscope (magnification, 1000-fold). Neuronal and the glial cells densities were determined

with the equation $\text{density} = (Q/t \times At) \text{ mm}^{-3}$ (for details, see: Sterio, 1984) where Q is the number of neuronal or glial nuclei in focus only in the look-up plane that did not touch the forbidden line or its extensions, t is the thickness of parallel sections pairs and At is the test area. For each brain, five random disector pairs were counted for the GrDG, four pairs were counted for the Mol, CA1 and CA3 while two pairs were counted for the CA2. Neurons were distinguished from glial cells because the former have nuclei with distinct nucleoli and a large mean nuclear diameter with a fair amount of chromatin, whereas glial cells have smaller nuclei with little chromatin on a clear background (Abreu-Villaça et al., 2002; Ribeiro-Carvalho et al., 2006). In each section, a grid composed of $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$ squares was positioned over each hippocampal region (magnification, 1000-fold) and neurons and glial cells were counted within the frames. The number of squares within which neurons or glial cells were counted varied according to the particular morphology of each hippocampal region. As a result, the final areas to be quantified were: GrDG, $18,000 \mu\text{m}^2$; Mol, $14,400 \mu\text{m}^2$; CA1, $14,400 \mu\text{m}^2$; CA2, $7200 \mu\text{m}^2$; CA3, $14,400 \mu\text{m}^2$.

1.5. Hippocampal thicknesses

Using the same slices in which cell densities were evaluated, analyses of the thicknesses of the different hippocampal regions were performed. As a result, five measurements were made for the GrDG, four for the Mol, CA1 and CA3, and two for the CA2. The thicknesses were measured with the aid of an eyepiece scale adapted to the microscope. The scale was placed perpendicularly in relation to the inner boundary of each of the areas in which measurements were carried out. The average thickness of each region was calculated and the results were used in the data analysis.

1.6. Data analysis of the effects on fluid intake/body weight and body weight

Initially, repeated-measures analyses of variance (rANOVA) on each variable (fluid intake/body weight and body weight) were carried out. Treatment and sex were used as between-subjects factors. Day was considered the within-subjects factor. Whenever significant Treatment interactions were detected, lower order ANOVAs followed by pairwise post hoc analyses (Fisher's protected least significant difference—FPLSD) were carried out. Where treatment effects did not interact with other variables, only the main effect was interpreted.

1.7. Data analysis of hippocampal regions

To reduce the likelihood of type 1 statistical errors that might result from repeated testing of the global data set, for each group of data (TUNEL-positive cells, neuronal and glial densities, region thickness), we first performed a global rANOVA on both factors: treatment and sex, utilizing log-transformation because of the heterogeneous variance among the different regions. The hippocampal regions (GrDG, Mol, CA1, CA2 and CA3) were treated as repeated measures, since each was obtained from the same brain. Whenever these initial tests indicated treatment effects that differed among different regions and sexes, data were then examined separately using lower-order ANOVAs followed by pairwise post hoc analyses (FPLSD). For all cases in which treatment effects did not interact with other variables, only the main effect was recorded, without testing of individual differences.

1.8. Data analysis of nicotine ethanol interactions

The one-dimensional statistical design described above, in which treatment (VEH, ETOH, NIC 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 was also used (Abreu-Villaça et al., 2004a,b, 2007, 2008; Ribeiro-Carvalho et al., 2008; Rhodes et al., 2003). 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.

1.9. General aspects of the data analysis

Significance was assumed at the level of $P < 0.05$ for main effects; however, for interactions at $P < 0.1$, we also examined whether lower-order main effects were detectable after subdivision of the interactive variables (Snedecor and Cochran, 1967). Data are compiled as means and standard errors.

1.10. Correlation analyses

Considering that animals had ad lib. access to the nicotine solution, variations in the amount of nicotine received were to be expected. In order to verify whether there were significant associations between the total amount of nicotine received

and the measured variables, Kendall's correlation coefficients (tau: τ) were calculated. The analysis was carried out initially using the entire data set and subsequently segmenting the data set into treatment (NIC and NIC + ETOH) and sex groups.

2. Results

2.1. Effects on fluid intake/body weight and body weight (Fig. 1)

Fluid intake/body weight increased throughout the exposure period (day: $F_{14,1064} = 39.3$, $P < 0.001$). Treatment affected the results (treatment: $F_{3,76} = 4.8$, $P = 0.004$; treatment $\times$ day: $F_{42,1064} = 1.3$, $P = 0.08$) with a rank order of $\text{VEH} = \text{ETOH} < \text{NIC} = \text{NIC} + \text{ETOH}$. Both NIC and NIC + ETOH exposures elicited significant and similar reductions in fluid intake/body weight relative to the VEH group throughout exposure, suggestive of an aversive taste effect (for the following days, results were significant: 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14). The bidimensional analysis indicated no significant nicotine $\times$ ethanol interaction, connoting the fact that ethanol exposure had little or no effect on fluid intake/body weight. The analysis of the Kendall's correlation coefficients indicated that the variations in the amount of nicotine that the animals (of the NIC and NIC + ETOH groups) consumed were not associated with any of the measured variables ($\tau < 0.1$, $P > 0.1$ in all cases).

Body weight significantly increased throughout the exposure period (day: $F_{14,1064} = 293.1$, $P < 0.001$). In spite of treatment effects in fluid intake/body weight, body weight gain was not affected by treatment—no effect or interactions were observed (males: $\text{VEH} = 15.0 \pm 1.1$; $\text{ETOH} = 13.5 \pm 1.1$; $\text{NIC} = 14.5 \pm 0.6$; $\text{NIC} + \text{ETOH} = 13.9 \pm 0.7$ and females: $\text{VEH} = 12.9 \pm 0.4$; $\text{ETOH} = 13.1 \pm 0.4$; $\text{NIC} = 12.5 \pm 0.6$; $\text{NIC} + \text{ETOH} = 12.8 \pm 0.7$).

2.2. Apoptotic cell death (Figs. 2 and 4)

The global rANOVA, using the one-dimensional design (four levels: VEH, ETOH, NIC and NIC + ETOH) across treatments, hippocampal regions and sexes identified a significant treatment effect ($F_{3,29} = 42.6$, $P < 0.001$). With nicotine and ethanol treatments considered as separate factors in a two-dimensional design, we found that the two dimensions interacted with each other (nicotine $\times$ ethanol: $F_{1,29} = 95.2$, $P < 0.001$) and with hippocampal regions (nicotine $\times$ ethanol $\times$ hippocampal regions: $F_{4,116} = 2.0$, $P = 0.09$). Given these results, data analysis was

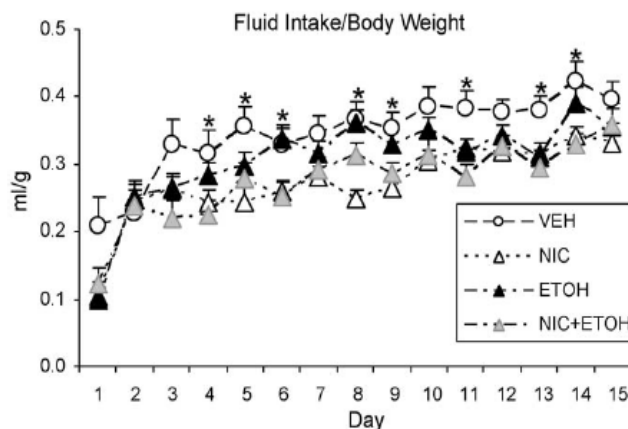


Fig. 1. Daily fluid intake/body weight throughout the exposure period (PN30–PN45). Both NIC and NIC+ETOH exposures elicited significant and similar reductions relative to the VEH group throughout exposure. Values are means $\pm$ SEM. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC + ETOH, nicotine and ethanol exposure group. *VEH significantly different from NIC and NIC + ETOH groups as revealed by FPLSD.

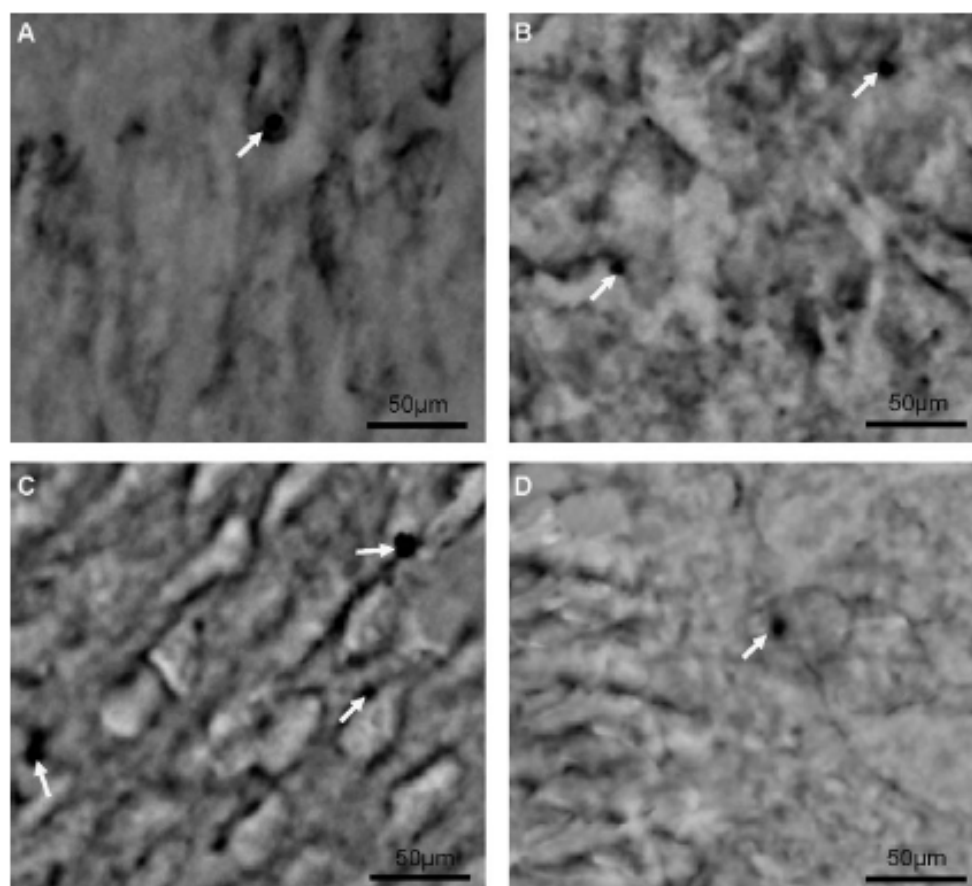


Fig. 2. Representative photomicrographs of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)-stained sections through the CA3 hippocampus region from: vehicle (A) nicotine (B), ethanol (C) and nicotine and ethanol (D) groups by the end of the period of exposure (PN45). TUNEL-positive cells (white arrows) are more frequent in nicotine and/or ethanol groups when compared to the vehicle group.

carried out separately on each hippocampal region and then the results were reexamined. Treatments were also interactive with sex: nicotine $\times$ ethanol $\times$ sex ($F_{1,29} = 3.1$, $P = 0.09$). So, after subdividing the data, we kept this factor in the analysis to see whether treatment interaction remained detectable.

TUNEL-positive cells were identified in all hippocampal regions of VEH mice, which confirms previous findings of apoptotic cell death during adolescence (Uysal et al., 2005). One-dimensional ANOVAs on each region identified significant treatment effects: GrDG ($F_{3,30} = 20.2$, $P < 0.001$), Mol ($F_{3,30} = 31.3$, $P < 0.001$); CA1 ($F_{3,30} = 38.7$, $P < 0.001$); CA2 ($F_{3,30} = 12.2$, $P < 0.001$); CA3 ($F = 46.9$, $df = 3,30$, $P < 0.001$). Post hoc analyses indicated that ethanol exposure elicited an increase in apoptotic cell number relative to the VEH group in all hippocampal regions ($P < 0.001$, FPLSD). Nicotine exposure elicited less severe region-dependent effects: the number of TUNEL-positive cells was significantly increased in the Mol ($P = 0.03$, FPLSD) and CA1 ($P = 0.002$, FPLSD) when compared to the VEH group. Animals receiving the combined NIC + ETOH treatment showed a reduced number of TUNEL-positive cells when compared to the NIC and ETOH groups in all hippocampal regions. Using the two-dimensional design (nicotine and ethanol treatments considered as separate factors in the ANOVA), we found nicotine $\times$ ethanol interactions for all hippocampal regions: GrDG ($F_{1,30} = 37.7$, $P < 0.001$), Mol ($F_{1,30} = 61.2$, $P < 0.001$); CA1 ($F_{1,30} = 81.9$, $P < 0.001$); CA2 ($F_{1,30} = 27.7$, $P < 0.001$); CA3 ($F_{1,30} = 76.4$, $P < 0.001$), indicative of less-than-additive effects of nicotine and ethanol: the neurotoxic effects of ethanol were reduced by nicotine co-exposure. There were no treatment $\times$ sex interactions, which indicates that the sex of the

animals was not a factor determinant of the number of apoptotic cells in the experimental groups.

2.3. Neuronal and glial densities (Figs. 3 and 5)

The one-dimensional global rANOVAs on neuronal density indicated a significant treatment effect ($F_{3,25} = 6.8$, $P = 0.001$) but no treatment $\times$ hippocampal regions interaction. Accordingly,

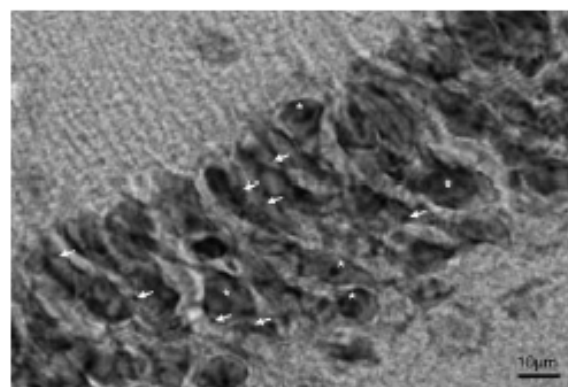


Fig. 3. Representative photomicrograph of a Nissl-stained section through the CA1 hippocampus region from a vehicle mouse brain by the end of the period of exposure (PN45). Neurons (asterisks) were distinguished from glial cells (white arrows) because the former have nuclei with distinct nucleoli and a large mean nuclear diameter with a fair amount of chromatin, whereas glial cells have smaller nuclei with little chromatin on a clear background.

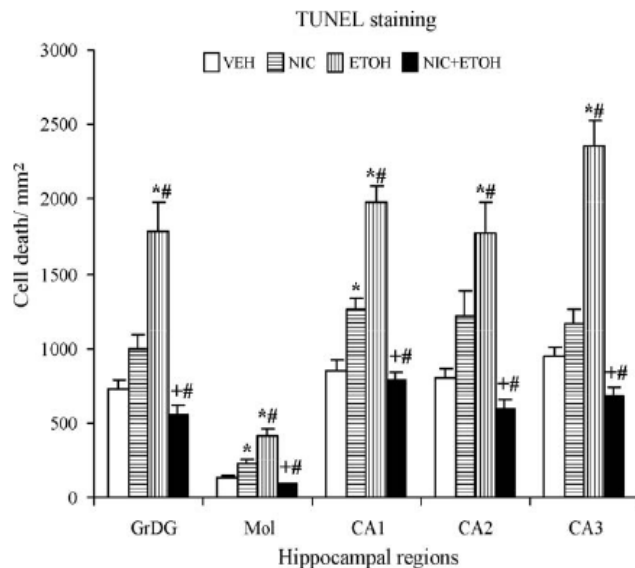


Fig. 4. Effects of adolescent nicotine and/or ethanol treatment on cell death as revealed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay by the end of the period of exposure (PN45). Ethanol exposure elicited an increase in TUNEL-positive cells relative to the vehicle group in all hippocampal regions. Nicotine exposure elicited less severe effects with TUNEL-positive cells significantly increased in the Mol and CA1 when compared to the vehicle group. Animals receiving the combined NIC + ETOH treatment showed a reduced number of TUNEL-positive cells when compared to the nicotine and ethanol groups in all hippocampal regions. Values are means $\pm$ SEM. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC + ETOH, nicotine and ethanol exposure group. * $P < 0.05$ vs. vehicle group; * $P < 0.05$ vs. nicotine group; * $P < 0.05$ vs. ethanol group as revealed by FPLSD.

lower-order tests of different hippocampal regions were not justified. NIC ($P < 0.05$), ETOH ($P < 0.001$) and combined NIC + ETOH ($P = 0.03$) treatment promoted a decrease in neuronal density when compared to VEH mice. The two-dimensional analysis indicated a significant nicotine $\times$ ethanol interaction ($F_{1,25} = 10.1$, $P = 0.004$), connoting the fact that the effects of combined exposure reflected less-than-additive effects of nicotine and ethanol.

Similarly to neuronal data, the global rANOVAs on glial density indicated a significant treatment effect ($F_{3,25} = 6.8$, $P = 0.002$). Accordingly, lower-order tests of different hippocampal regions were not justified. NIC ($P < 0.05$), ETOH ($P < 0.001$) and combined NIC + ETOH ($P = 0.02$) treatment promoted a decrease in glial density when compared to VEH mice. With nicotine and ethanol treatments considered as two dimensions, we found a significant nicotine $\times$ ethanol interaction ($F_{1,25} = 8.8$, $P = 0.006$), thus indicating less than additive effects of nicotine and ethanol.

Glial/neuron ratios varied depending on the region ($F_{4,100} = 3.7$, $P = 0.008$). However, the ratios were not affected by nicotine and/or ethanol treatments (Table 1).

2.4. Hippocampal thicknesses (Fig. 6)

The thicknesses of the different hippocampal regions were not affected by any of the treatments: neither the one- nor the two-dimensional analyses indicated any effects or interactions.

Table 1
Glial/neuron ratios.

	GrDG	Mol	CA1	CA2	CA3
VEH	1.99	3.03	1.91	2.05	2.16
NIC	1.92	2.58	1.98	2.22	2.38
ETOH	2.03	2.01	2.08	2.12	2.24
NIC + ETOH	1.92	2.28	1.86	2.19	2.10

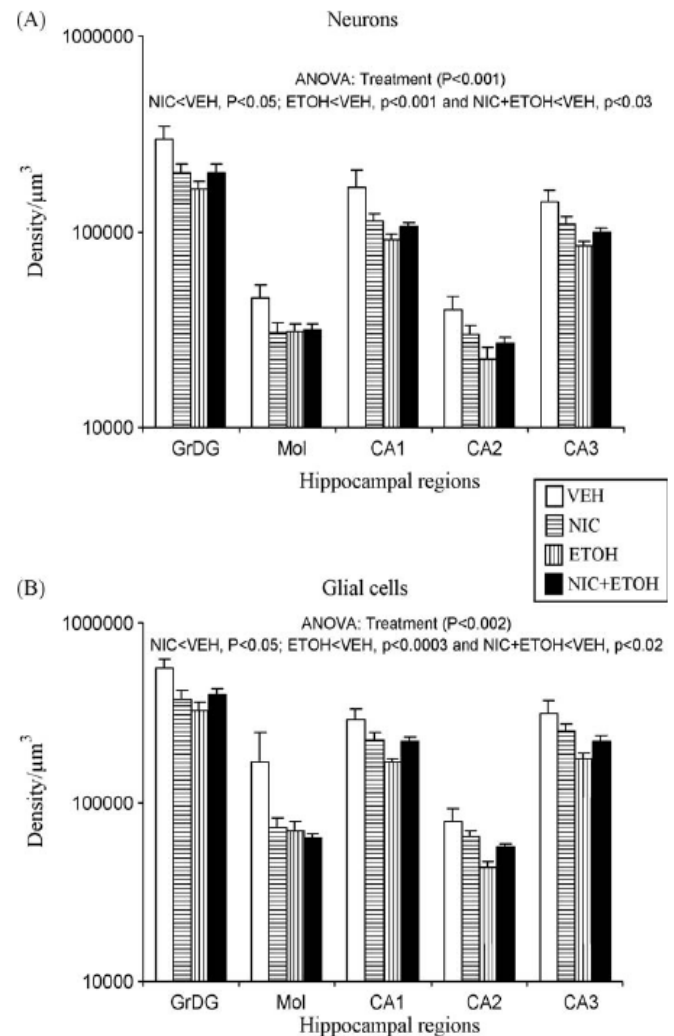


Fig. 5. Effects of adolescent nicotine and/or ethanol treatment on neuronal (A) and glial (B) densities by the end of the period of exposure (PN45). Across hippocampal regions, nicotine, ethanol and nicotine + ethanol treatment promoted a decrease in neuronal and glial densities when compared to vehicle mice. Values are means $\pm$ SEM represented in logarithmic scale. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC + ETOH, nicotine and ethanol exposure group. Differences between groups as revealed by FPLSD.

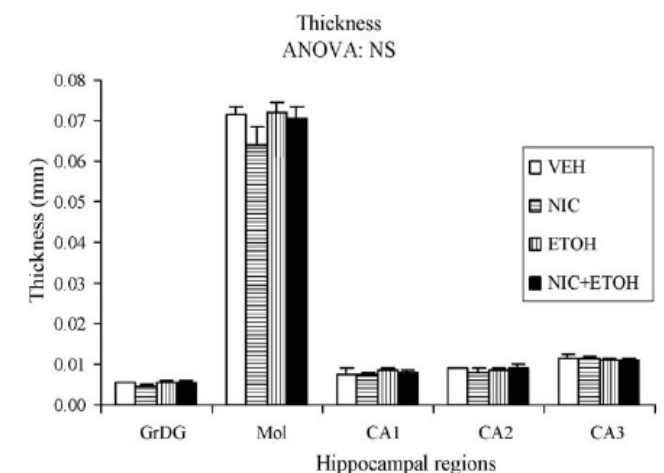


Fig. 6. Effects of adolescent nicotine and/or ethanol treatment on hippocampal regions thicknesses by the end of the period of exposure (PN45). There were no significant differences between groups. Values are means $\pm$ SEM. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC + ETOH, nicotine and ethanol exposure group.

3. Discussion

Our results demonstrate that nicotine and ethanol exposures during adolescence produce a significant increase in apoptotic cell death in hippocampal regions and that cell death is associated with reduced neuronal and glial cells densities. In addition, the combined nicotine and ethanol exposure reduced the adverse effects of the drugs when administered separately. In light of recent findings that nicotine and ethanol interact during adolescence eliciting behavioral alterations (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008), our findings provide evidence that these effects represent, at least in part, underlying neurotoxic outcomes in the adolescent brain. The ensuing paragraphs elaborate these essential conclusions and propose that effects of nicotine and ethanol in brain cells may explain epidemiologic findings of the combined tobacco and ethanol consumption during adolescence.

3.1. Methodological issues

Rats and some strains of mice have a taste aversion to nicotine. C57BL/6 adult and periadolescent mice consume nicotine in the concentration used in the present study (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007, 2008; Klein et al., 2003, 2004; Ribeiro-Carvalho et al., 2008; Sparks and Pauly, 1999). In fact, oral nicotine has been shown to be effective in eliciting behavioral (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007, 2008; Adriani et al., 2002, 2004; Gädénäs et al., 2001; Manhães et al., 2008) and neurochemical alterations (Gädénäs et al., 2001; Nuutinen et al., 2005; Ribeiro-Carvalho et al., 2008; Sparks and Pauly, 1999; Tammimäki et al., 2006) as well as altered expression of genes implicated in synaptic plasticity induced by drugs of abuse (Marttila et al., 2006) in this and other mouse strains. This strain of mice is known to present particular features, such as higher voluntary ethanol consumption (Crawley et al., 1997), 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 (Crabbe et al., 1999). 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. Though nicotine concentration may seem high in the drinking solution, nicotine absorption from the buccal cavity yields cotinine (a nicotine metabolite) plasma levels (Klein et al., 2003, 2004; Ribeiro-Carvalho et al., in press; Sparks and Pauly, 1999) comparable to those found in adolescent smokers (Binnie et al., 2004; Caraballo et al., 2004; Wood et al., 2004). As for ethanol, according to previous studies in adolescent rodents (Silveri and Spear, 2000) and recent data from our laboratory (Ribeiro-Carvalho et al., in press), the dose used in the present study resulted in ethanol blood levels (137.2 ± 8.5 mg/dl) that are within the range that a human adolescent would be exposed to after ingestion of a moderate dose of ethanol (Eckardt et al., 1998).

Nicotine and ethanol pharmacokinetic interactions could explain the less-than-additive effects of the combined exposure. In this regard, previous findings show that ethanol plasma levels are reduced among animals that receive simultaneous exposure to ethanol and nicotine (Chen and Harle, 2005; Gilbertson and Barron, 2005). However, this reduction was only described in animals that received oral ethanol, and it was demonstrated that it is related to a nicotine-induced delay in gastric emptying (Chen and Harle, 2005; Gilbertson and Barron, 2005; Nowak et al., 1987;

Scott et al., 1993). Recent data from our laboratory show that cotinine plasma levels do not differ between NIC and NIC + ETOH exposed mice and; in the same way, ethanol levels are not affected by nicotine exposure (Ribeiro-Carvalho et al., in press). In fact, previous studies have shown that i.p. ethanol concentrations are not affected by chronic nicotine exposure (Parnell et al., 2006) and nicotine exposure does not affect the elimination rate of ethanol (Collins et al., 1988). Accordingly, it is unlikely that metabolic nicotine-ethanol interactions alone can explain the current findings.

3.2. Apoptotic cell death

In our study, TUNEL staining revealed a substantial number of apoptotic cells in GrDG, Mol, CA1, CA2 and CA3 of animals treated with ethanol, indicating that the neurotoxic effect of ethanol is not limited to any particular hippocampal field, but unselectively affects several hippocampal areas. The increase in the number of apoptotic cells is caused, in part, by NMDA receptor-mediated decrease in Ca^{2+} flux, associated with decreased CREB activation and secondary decrease in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Crews and Nixon, 2009; Zou and Crews, 2006). It is conceivable that this mechanism is more sensitive to ethanol in adolescents than in adult rodents, which would suggest a greater sensitivity to its adverse effects during this period of development (Pyapali et al., 1999; Swartzwelder et al., 1995). It should be mentioned that repeated withdrawal, as produced by the intermittent (every other day) exposure performed in the present study, markedly increases the effects on neural cells of the activity of NMDA receptors (Harper and Matsumoto, 2005), possibly contributing to the cell damage we observed by the end of the period of exposure. It is established that prenatal ethanol exposure elicits extensive brain cell death (Ikonomidou et al., 2000; Olney et al., 2002). Hippocampal lesions during the neonatal period have been shown to produce characteristics similar to those demonstrated in animals exposed to ethanol prenatally, such as spatial and memory deficits (Bannerman et al., 1999; Berman and Hannigan, 2000; van Praag et al., 1998). Thus, hippocampal damage seems to be associated with broad behavioral deficits. Previous studies demonstrate that the period of sensitivity to ethanol-induced neurotoxicity extends into adolescence (Crews et al., 2000, 2006). Considering the role of hippocampal circuits in both anxiety and memory/learning events (for review: Billard, 2006; Engin and Treit, 2007; Small, 2002), anxiolytic effects and memory/learning deficits elicited by ethanol exposure during adolescence (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008) are likely to be associated with our findings of hippocampal cell death.

The results in this report support the notion that nicotine exposure elicits an increase in programmed cell death. However, nicotine-elicited effects are less severe and region-dependent when compared to ethanol effects. Nicotine has many effects on central nervous system functions, presumably through its action on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Nicotine evokes brain cell death during neurulation (Roy et al., 1998). Berger and collaborators (1998) have shown that nicotine has a cytotoxic effect in hippocampal progenitor cells. One possibility is that, in these cells, influx of Ca^{2+} triggers the programmed cell death pathway (Berger et al., 1998; Saitoh et al., 2001). There is an emerging literature published over the past several years showing the differential responsivity of adolescents to nicotine. Jang et al. (2002) have demonstrated that not only ethanol but also nicotine increase the number of TUNEL-positive cells in the dentate gyrus of adolescent rats. In addition, even a brief period of nicotine exposure during adolescence is sufficient to cause persistent changes indicative of brain cell damage in the hippocampus and

other brain regions (Abreu-Villaça et al., 2003b, 2004b). However, even though the findings regarding nicotine exposure indicate that the brain is vulnerable to nicotine-induced neurotoxicity when nicotine is given during adolescence (Abreu-Villaça et al., 2003b; Jang et al., 2002), the effects are less severe than those described for prenatal exposure (for review: Slotkin, 2008). The subtle neurotoxic effects of nicotine described here may explain the lack of significant effects of nicotine on memory/learning and anxiety levels in previous reports that used the same experimental design described in the present study (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008). Furthermore, they may also have affected previous results in which hippocampal neurotoxic effects of ethanol exposure, but not of nicotine, were observed (Mulholland et al., 2003; Prendergast et al., 2001; White and Swartzwelder, 2004).

Adolescent mice that received the combined nicotine and ethanol treatment showed a reduced number of TUNEL-positive cells when compared to the nicotine and ethanol groups in all hippocampal regions, indicative of less-than-additive effects of nicotine and ethanol. As discussed above, nicotine was previously shown to cause increased intracellular Ca^{2+} concentration, which may trigger the programmed cell death pathway preferentially in differentiating/immature cells, which lack adequate buffering systems (Berger et al., 1998; Saitoh et al., 2001). Ethanol, in turn, elicits a decrease in Ca^{2+} flux, which, ultimately, may also elicit cell death (Crews and Nixon, 2009; Zou and Crews, 2006). Accordingly, the opposing effects of nicotine and ethanol on Ca^{2+} might explain the reduced neurotoxic effect of the combined exposure. Paradoxically, nicotine exposure was also shown to reduce the neurotoxic consequences of Ca^{2+} dysregulation, putatively through up-regulation of the Ca^{2+} -buffering protein calbindin-D28k, while ethanol down-regulated the calbindin-D28k system in the hippocampus (Mulholland et al., 2003). However, it must be pointed out that the aforementioned study was carried out in hippocampal slices from postnatal rats, which contain differentiated cells, in which this buffering mechanism is fully functional. Considering that the maturing hippocampus of adolescent mice has cells in all stages of development, it is possible that both mechanisms described above are present and that the final outcome of our exposure is the result of the summation of both effects. Even though the exact mechanisms that explain nicotine + ethanol interactions still need to be elucidated, other actions of nicotine that seem to have a role mediating its neuroprotective effects against other neurotoxins, such as activation of fibroblast growth factor (Belluardo et al., 2000) and inactivation of L-type calcium channels (Stevens et al., 2003), have also been identified. In fact, nicotine has also been shown to inhibit ethanol-induced neurotoxicity in cultured cortical and cerebellar cells (Tizabi et al., 2003, 2004). These results may have implications in the biochemical basis of interactions between nicotine and ethanol and the effects of these drugs on behavior. In this regard, less-than-additive effects of nicotine and ethanol have been described: ethanol exposure was previously shown to be anxiolytic in adolescent mice while nicotine *per se* failed to affect anxiety levels. In contrast, when nicotine was co-administered with ethanol, ethanol anxiolytic effects were no longer identified (Abreu-Villaça et al., 2008).

3.3. Neuronal and glial densities, and region thicknesses

The results described above do not allow us to identify which types of cells are targeted by nicotine and/or ethanol, neurons or glia. However, as discussed below, our findings suggest that both are sensitive to the neurotoxic effects of these drugs.

Our results indicated reductions in neuronal and glial cells densities due to nicotine and ethanol exposures. Nicotine + ethanol

deleterious effects were also significant, albeit of smaller magnitude. Glial/neuron ratios for the hippocampal regions were not affected by nicotine and/or ethanol treatments, which indicates that these cell populations were equally affected by these drugs. Apoptotic cells persist in the organism for up to 48 h (Crews et al., 2000; Switzer, 2000), therefore, the TUNEL staining at one time point, as performed in the present study, is not able to label the totality of cells that die during the exposure period. In contrast, by using the disector method, we were able to reveal the outcome from the whole exposure period but we failed in identifying whether events such as cell death and/or reduced neurogenesis are taking place. Accordingly, the combined techniques allowed for the identification of cell death as responsible, at least in part, for the reduced neuronal and glial densities. Finally, the reduction of neuronal and glial densities associated with comparatively normal thicknesses of hippocampal regions suggests that nicotine and/or ethanol treatments results in a reduced number of neuronal and glial cells in these regions. This finding constitutes an endorsement of the hypothesis that these neurotoxins affect brain development during adolescence. At this juncture, it is not possible to rule out that reduced neurogenesis plays a role in density results. In fact, despite the fact that TUNEL-staining was of similar intensity in the vehicle and combined nicotine + ethanol groups, both neuronal and glial densities were reduced by the co-exposure. These results support the hypothesis that these drugs negatively affect neurogenesis in the hippocampus, which is consonant with earlier conclusions (Abrous et al., 2002; Crews et al., 2006; Klintsova et al., 2007; Shingo and Kito, 2005).

Several studies describing effects of nicotine and ethanol during development have focused on neuronal effects. Nicotine effects during adolescence include more profound and persistent upregulation of nAChRs as compared to adults, impairment of synaptic activity of monoaminergic systems and neural cell damage (for review: Slotkin, 2008). As for ethanol, administration during adolescence causes neural cell damage as well as changes in cholinergic, dopaminergic and glutamatergic systems (Pascual et al., 2009; Ribeiro-Carvalho et al., 2008; White and Swartzwelder, 2004). Additionally, both nicotine and ethanol were shown to affect glial cells. For instance, there is evidence that adolescent nicotine exposure elicits a decrease in glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker for astrocytes (Xu et al., 2003). As for ethanol, very low doses ($\text{BEC} = 19 \pm 5 \text{ mg/dl}$) elicited increased GFAP levels (Evrard et al., 2006). Our results demonstrating a decrease in the number of glial cells is consonant with nicotine-elicited GFAP reduction (Xu et al., 2003), however, to our knowledge, this is the first evidence that moderate doses of ethanol during adolescence elicits a decrease in the density of glial cells. Nicotine and ethanol co-administration also resulted in a reduction in the density of neurons and glial cells, albeit of smaller magnitude and, as discussed above, the exact mechanisms that explain this interaction still need to be elucidated. Recent reports have shown that astrocytes support the proliferation and differentiation of stem cells *in vitro* (Seki, 2003). Furthermore, astrocytes play a critical role in neuromodulation, neuroprotection, axon guidance control during development, homeostasis preservation and blood–brain barrier maintenance (Ridet et al., 1997). Accordingly, it is possible that deleterious effects of nicotine and ethanol in neurons are indirect, possibly mediated by effects in glial cells.

3.4. Biological mechanisms that may contribute to combined tobacco and alcoholic beverages consumption

The biological mechanisms that underlie the development of tobacco and alcohol use and abuse among adolescents are poorly understood. In this regard, both ethanol and nicotine were shown

to affect dopaminergic function (Leonard and Bertrand, 2001; Gessa et al., 1985) and there is evidence that nicotine–ethanol co-consumption results, at least in part, from stimulating effects of these drugs on this system. Dopamine receptor gene polymorphisms have been associated with higher levels of alcohol and cigarette consumption in both adults (Connor et al., 2007) and adolescents (Skowronek et al., 2006). In rats, simultaneous administration of ethanol and nicotine results in an additive dopamine release in the nucleus accumbens (Tizabi et al., 2007). Other mechanisms may also play a role: for instance, adolescent nicotine and ethanol combined exposure was shown to elicit stronger nAChR upregulation in brain regions of mice (Ribeiro-Carvalho et al., 2008). In addition, the present study provides experimental evidence for functional interactions between nicotine and ethanol in neuronal and glial survival in adolescent mice. Both nicotine and ethanol adolescent exposures elicited brain cell damage and the combined exposure elicited less severe effects. In spite of the fact that generalizations to the adolescent human population should be carried out with care due to inherent differences between species, we suggest that the association between smoking and consumption of alcoholic beverages described in epidemiological studies (Carmody et al., 1985; Dawson, 2000; DiFranza and Guerreria, 1990; Grant, 1998; Larsson and Engel, 2004; Meyerhoff et al., 2006; Patten et al., 1996) can be explained, at least in part, by the ability of nicotine and ethanol co-exposure to lessen the adverse effects of nicotine and ethanol. Future studies should be carried out in order to verify whether the effects observed here during adolescence co-exposure are limited to this period of development or if they are also found at other developmental periods and/or at adulthood.

Acknowledgements

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).

References

- Abreu-Villaça, Y., Silva, W.C., Manhães, A.C., Schmidt, S.L., 2002. The effect of corpus callosum agenesis on neocortical thickness and neuronal density of BALB/cCF mice. *Brain Res. Bull.* 58, 411–416.
- Abreu-Villaça, Y., Seidler, F.J., Qiao, D., Tate, C.A., Cousins, M.M., Thillai, I., Slotkin, T.A., 2003a. Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Neuropsychopharmacology* 28, 1935–1949.
- Abreu-Villaça, Y., Seidler, F.J., Tate, C.A., Slotkin, T.A., 2003b. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Res.* 979, 114–128.
- Abreu-Villaça, Y., Seidler, F., Slotkin, T.A., 2004a. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology* 29, 1440–1450.
- Abreu-Villaça, Y., Seidler, F.J., Tate, C.A., Cousins, M.M., Slotkin, T.A., 2004b. Prenatal nicotine exposure alters the response to nicotine administration in adolescence: effects on cholinergic systems during exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 29, 879–890.
- Abreu-Villaça, Y., Queiroz-Gomes, F.E., Dal Monte, A.P., Filgueiras, C.C., Manhães, A.C., 2006. 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.* 167, 175–182.
- Abreu-Villaça, Y., Medeiros, A.H., Lima, C.S., Faria, F.P., Filgueiras, C.C., Manhães, A.C., 2007. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. *Behav. Brain Res.* 181, 136–146.
- Abreu-Villaça, Y., Nunes, F., Queiroz-Gomes, F.E., Manhães, A.C., Filgueiras, C.C., 2008. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short term and long term withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 33, 599–610.
- Abrous, D.N., Adriani, W., Montaron, M.F., Aurousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M., Piazza, P.V., 2002. Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J. Neurosci.* 22, 3656–3662.
- Adriani, W., Macri, S., Pacifici, R., Laviola, G., 2002. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology* 27, 212–224.
- Adriani, W., Granstrem, O., Macri, S., Izykova, G., Dambinova, S., Laviola, G., 2004. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology* 29, 869–878.
- Amaral, D.G., Burwell, R.D., Witter, M.P., 1995. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5, 390–408.
- Bannerman, D.M., Yee, B.K., Good, M.A., Heupel, M.J., Iversen, S.D., Rawlins, J.N., 1999. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behav. Neurosci.* 113, 1170–1188.
- Belluardo, N., Mudo, G., Blum, M., Fuxe, K., 2000. Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav. Brain Res.* 113, 21–34.
- Berger, F., Gage, F.H., Vijayaraghavan, S., 1998. Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J. Neurosci.* 18, 6871–6881.
- Berman, R.F., Hannigan, J.H., 2000. Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. *Hippocampus* 10, 94–110.
- Billard, J.M., 2006. Ageing, hippocampal synaptic activity and magnesium. *Magnesium Res.* 19, 199–215.
- Binnie, V., McHugh, S., Macpherson, L., Borland, B., Moir, K., Malik, K., 2004. The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine. *Oral Dis.* 10, 287–293.
- Caraballo, R.S., Giovino, G.A., Pechacek, T.F., 2004. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine Tob. Res.* 6, 19–25.
- Carmody, T.P., Brischetto, C.S., Matarazzo, J.D., O'Donnell, R.P., Connor, W.E., 1985. Co-occurrence of cigarettes, alcohol, and coffee in healthy, community-living men and women. *Health Psychol.* 4, 323–335.
- Chen, W.J., Harle, L.K., 2005. Interactive effect of alcohol and nicotine on developing cerebellum: an investigation of the temporal pattern of alcohol and nicotine administration. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 437–442.
- Collins, A.C., Burch, J.B., de Fiebre, C.M., Marks, M.J., 1988. Tolerance to and cross tolerance between ethanol and nicotine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29, 365–373.
- Connor, J.P., Young, R.M., Lawford, B.R., Saunders, J.B., Ritchie, T.L., Noble, E.P., 2007. Heavy nicotine and alcohol use in alcohol dependence is associated with D2 dopamine receptor (DRD2) polymorphism. *Addict. Behav.* 32, 310–319.
- Crabbe, J.C., Wahlsten, D., Dudek, B.C., 1999. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284, 1670–1672.
- Crawley, J.N., Belknap, J.K., Collins, A., Crabbe, J.C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R.J., Maxson, S.C., Miner, L.L., Silva, A.J., Wehner, J.M., Wynshaw-Boris, A., Paylor, R., 1997. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 132, 107–124.
- Crews, F.T., Braun, C.J., Hoplight, B., Switzer 3rd, R.C., Knapp, D.J., 2000. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24, 1712–1723.
- Crews, F.T., Mdzinarishvili, A., Kim, D., He, J., Nixon, K., 2006. Neurogenesis in adolescent brain is potentially inhibited by ethanol. *Neuroscience* 137, 437–445.
- Crews, F.T., Nixon, K., 2009. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 44, 115–127.
- Dawson, D.A., 2000. Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend.* 59, 235–249.
- DiFranza, J.R., Guerreria, M.P., 1990. Alcoholism and smoking. *J. Stud. Alcohol* 51, 130–135.
- Eckardt, M.J., File, S.E., Gessa, G.L., Grant, K.A., Guerri, C., Hoffman, P.L., Kalant, H., Koob, G.F., Li, T.K., Tabakoff, B., 1998. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 998–1040.
- Engin, E., Treit, D., 2007. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav. Pharmacol.* 18, 365–374.
- Evrard, S.G., Duhalde-Veja, M., Tagliaferro, P., Mirochnic, S., Caltana, L.R., Brusco, A., 2006. A low chronic ethanol exposure induces morphological changes in the adolescent rat brain that are not fully recovered even after a long abstinence: an immunohistochemical study. *Exp. Neurol.* 200, 438–459.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Gäddnäs, H., Pietilä, K., Piepponen, T.P., Ahtee, L., 2001. Enhanced motor activity and brain dopamine turnover in mice during long-term nicotine administration in the drinking water. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 70, 497–503.
- Gardella, D., Hatton, W.J., Rind, H.B., Rosen, G.D., Von Bartheld, C.S., 2003. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical dissection counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *J. Neurosci. Methods* 124, 45–59.
- Gessa, G.L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L., Mereu, G., 1985. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.* 348, 201–203.
- Giedd, J.N., 2008. The teen brain: insights from neuroimaging. *J. Adolesc. Health* 42, 335–343.
- Gilbertson, R.J., Barron, S., 2005. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 54–64.

- Goodlett, C.R., Horn, K.H., Zhou, F.C., 2005. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 230, 394–406.
- Grant, B.F., 1998. 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* 10, 59–73.
- Harper, C., Matsumoto, I., 2005. Ethanol and brain damage. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 73–78.
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovskova, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W., 2000. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287, 1056–1060.
- Jang, M.H., Shin, M.C., Jung, S.B., Lee, T.H., Bahn, G.H., Kwon, Y.K., Kim, E.H., Kim, C.J., 2002. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuro Report* 13, 1509–1513.
- Kandel, E.R., Bailey, C.H., Giustetto, M., Huang, Y.Y., Hawkins, R.D., 2000. Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 11–20 (Review).
- Klein, L.C., Stine, M.M., Pfaff, D.W., Vandenberg, D.J., 2003. Maternal nicotine exposure increases nicotine preference in periadolescent male but not female C57BL/6 mice. *Nicotine Tob. Res.* 5, 117–124.
- Klein, L.C., Stine, M.M., Vandenberg, D.J., Whetzel, C.A., Kamens, H.M., 2004. Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 13–25.
- Klintsova, A.Y., Helfer, J.L., Calizo, L.H., Dong, W.K., Goodlett, C.R., Greenough, W.T., 2007. Persistent impairment of hippocampal neurogenesis in young adult rats following early postnatal alcohol exposure. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 31, 2073–2082.
- Larsson, A., Engel, J.A., 2004. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 713–720.
- Leonard, S., Bertrand, D., 2001. Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine Tob. Res.* 3, 203–223.
- Levin, E.D., Slotkin, T.A., 1998. Developmental neurotoxicity of nicotine. In: Slikker, W., Chang, I.W. (Eds.), *Handbook of Developmental Neurotoxicology*. Academic Press, San Diego, pp. 587–615.
- Lu, L., Bao, G., Chen, H., Xia, P., Fan, X., Zhang, J., Pei, G., Ma, L., 2003. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp. Neurol.* 183, 600–609.
- Mandarin-de-Lacerda, C.A., 2003. Stereological tools in biomedical research. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 75, 469–486.
- Manhães, A.C., Gutierrez, M.C., Filgueiras, C.C., Abreu-Villaça, Y., 2008. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* 193, 216–224.
- Marttila, K., Raattamaa, H., Ahtee, L., 2006. Effects of chronic nicotine administration and its withdrawal on striatal FosB/DeltaFosB and c-Fos expression in rats and mice. *Neuropharmacology* 51, 44–51.
- Meyerhoff, D.J., Tizabi, Y., Staley, J.K., Durazzo, T.C., Glass, J.M., Nixon, S.J., 2006. Smoking comorbidity in alcoholism: neurobiological and neurocognitive consequences. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 253–264.
- Milotová, M., Rířák, V., Jandová, K., Bortelová, J., Maresová, D., Pokorný, J., Langmeier, M., 2008. Changes of hippocampal neurons after perinatal exposure to ethanol. *Physiol. Res.* 57, 275–282.
- Miki, T., Satriotomo, I., Li, H.P., Matsumoto, Y., Gu, H., Yokoyama, T., Lee, K.Y., Bedi, K.S., Takeuchi, Y., 2005. Application of the physical disector to the central nervous system: estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus. *Anat. Sci. Int.* 80, 153–162.
- Mulholland, P.J., Harris, B.R., Wilkins, L.H., Self, R.L., Blanchard, J.A., Holley, R.C., Littleton, J.M., Prendergast, M.A., 2003. Opposing effects of ethanol and nicotine on hippocampal calbindin-D28k expression. *Alcohol* 31, 1–10.
- National Institute on Drug Abuse, 1998. Nicotine addiction, p. 7. NIH Publication Number 98-4342, Washington, DC.
- Nelson, D.E., Giovino, G.A., Shopland, D.R., Mowery, P.D., Mills, S.L., Eriksen, M.P., 1995. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *Am. J. Public Health* 85, 34–40.
- Nowak, A., Janderko, K., Kaczor, R., Nowak, S., Skrzypek, D., 1987. Cigarette smoking delays gastric emptying of a radiolabelled solid food in healthy smokers. *Scand. J. Gastroenterol.* 22, 54–58.
- Nuutinen, S., Ahtee, L., Tuominen, R.K., 2005. Time and brain region specific up-regulation of low affinity neuronal nicotinic receptors during chronic nicotine administration in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 515, 83–89.
- Olney, J.W., Tenkova, T., Dikranian, K., Qin, Y.Q., Labruyere, J., Ikonomidou, C., 2002. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res. Dev.* 133, 115–126.
- Parnell, S.E., West, J.R., Chen, W.J., 2006. Nicotine decreases blood alcohol concentrations in adult rats: a phenomenon potentially related to gastric function. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 1408–1413.
- Pascual, M., Boix, J., Felipo, V., Guerri, C., 2009. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *J. Neurochem.* 108, 920–931.
- Pascual, M., Blanco, A.M., Cauli, O., Miñarro, J., Guerri, C., 2007. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioral alterations in adolescent rats. *Eur. J. Neurosci.* 25, 541–550.
- Patten, C.A., Martin, J.E., Owen, N., 1996. Can psychiatric and chemical dependency treatment units be smoke free? *J. Subst. Abuse Treat.* 13, 107–118.
- Prendergast, M.A., Harris, B.R., Mayer, S., Holley, R.C., Hauser, K.F., Littleton, J.M., 2001. Chronic nicotine exposure reduces N-methyl-aspartate receptor-mediated damage in the hippocampus without altering calcium accumulation or extrusion: evidence of calbindin-D28K overexpression. *Neuroscience* 102, 75–85.
- Pyapali, G.K., Turner, D.A., Wilson, W.A., Swartzwelder, H.S., 1999. Age and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation. *Alcohol* 19, 107–111.
- Ribeiro-Carvalho, A., Manhães, A.C., Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C.C., 2006. Early callosal absence disrupts the establishment of normal neocortical structure in Swiss mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24, 15–21.
- Ribeiro-Carvalho, A., Lima, C.S., Filgueiras, C.C., Manhães, A.C., Abreu-Villaça, Y., 2008. Nicotine and ethanol interact during adolescence: effects on the central cholinergic systems. *Brain Res.* 1232, 48–60.
- Ribeiro-Carvalho, A., Lima, C.S., Medeiros, A.H., Siqueira, N.R., Filgueiras, C.C., Manhães, A.C., Abreu-Villaça, Y., in press. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience*, doi:10.1016/j.neuroscience.2009.05.032.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H., 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological functions. *Trends Neurosci.* 20, 570–577.
- Rhodes, M.C., Seidler, F.J., Qiao, D., Tate, C.A., Cousins, M.M., Thillai, I., Slotkin, T.A., 2003. 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.* 195, 203–217.
- Roy, T.S., Andrews, J.E., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 1998. Nicotine evokes cell death in embryonic rat brain during neurulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 1136–1144.
- Saitoh, T., Tanaka, S., Koike, T., 2001. Rapid induction and Ca(2+) influx-mediated suppression of vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1) mRNA in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J. Neurochem.* 78, 1267–1276.
- Scott, A.M., Kellow, J.E., Shuter, B., Nolan, J.M., Hoschl, R., Jones, M.P., 1993. Effects of cigarette smoking on solid and liquid intragastric distribution and gastric emptying. *Gastroenterology* 104, 410–416.
- Seki, T., 2003. Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. *Anat. Sci. Int.* 78, 69–78.
- Shingo, A.S., Kito, S., 2005. Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons. *J. Neural. Transm.* 112, 1475–1478.
- Silver, M.M., Spear, L.P., 2000. Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol* 20, 45–53.
- Skowronek, M.H., Laucht, M., Hohm, E., Becker, K., Schmidt, M.H., 2006. Interaction between the dopamine D4 receptor and the serotonin transporter promoter polymorphisms in alcohol and tobacco use among 15-year-olds. *Neurogenetics* 7, 239–246.
- Slotkin, T.A., 2008. If nicotine is a developmental neurotoxicant in animal studies, dare we recommend nicotine replacement therapy in pregnant women and adolescents? *Neurotoxicol. Teratol.* 30, 1–19.
- Small, S.A., 2002. The longitudinal axis of the hippocampal formation: its anatomy, circuitry, and role in cognitive function. *Rev. Neurosci.* 13, 183–194.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1967. *Statistical Methods*, 6th ed. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Sparks, J.A., Pauly, J.R., 1999. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology* 141, 145–153.
- Spear, L.P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417–463.
- Sterio, D.C., 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134, 127–136.
- Stevens, T.R., Krueger, S.R., Fitzsimonds, R.M., Picciotto, M.R., 2003. Neuroprotection by nicotine in mouse primary cortical cultures involves activation of calcineurin and l-type calcium channel inactivation. *J. Neurosci.* 23, 10093–10099.
- Swartzwelder, H.S., Wilson, W.A., Tayyeb, M.I., 1995. Age-dependent inhibition of long-term potentiation by ethanol in immature versus mature hippocampus. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 19, 1480–1485.
- Switzer 3rd, R.C., 2000. Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. *Toxicol. Pathol.* 28, 70–83.
- Tammimäki, A., Pietilä, K., Raattamaa, H., Ahtee, L., 2006. Effect of quinpirole on striatal dopamine release and locomotor activity in nicotine-treated mice. *Eur. J. Pharmacol.* 531, 118–125.
- Tizabi, Y., Al-Namaeh, M., Manaye, K.F., Taylor, R.E., 2003. Protective effects of nicotine on ethanol-induced toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Neurotoxicol. Res.* 5, 315–321.
- Tizabi, Y., Manaye, K.F., Smoot, D.T., Taylor, R.E., 2004. Nicotine inhibits ethanol-induced toxicity in cultured cerebral cortical cells. *Neurotox. Res.* 6, 311–316.
- Tizabi, Y., Bai, L., Copeland Jr., R.L., Taylor, R.E., 2007. Combined effects of systemic alcohol and nicotine on dopamine release in the nucleus accumbens shell. *Alcohol Alcohol.* 42, 413–416.
- Uysal, N., Tugyan, K., Kayatekin, B.M., Acikgoz, O., Bagriyanik, H.A., Gonenc, S., Ozdemir, D., Aksu, I., Topcu, A., Semin, I., 2005. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci. Lett.* 383, 241–245.
- van Praag, H., Qu, P.M., Elliott, R.C., Wu, H., Dreyfus, C.F., Black, I.B., 1998. Unilateral hippocampal lesions in newborn and adult rats: effects on spatial memory and BDNF gene expression. *Behav. Brain Res.* 92, 21–30.

- Xu, Z., Seidler, F.J., Tate, C.A., Garcia, S.J., Slikker Jr., W., Slotkin, T.A., 2003. Sex-selective hippocampal alterations after adolescent nicotine administration: effects on neurospecific proteins. *Nicotine Tob. Res.* 5, 955–960.
- White, A.M., Swartzwelder, H.S., 2004. Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1021, 206–220.
- Wood, T., Wewers, M.E., Groner, J., Ahijevych, K., 2004. Smoke constituent exposure and smoking topography of adolescent daily cigarette smokers. *Nicotine Tob. Res.* 6, 853–862.
- Zou, J., Crews, F., 2006. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26, 385–405.

Hippocampal Increased Cell Death and Decreased Cell Density Elicited by Nicotine and/or Ethanol during Adolescence are Reversed with Prolonged Drug Withdrawal

Andreia Oliveira-da-Silva, Ph.D., Alex C. Manhães, Ph.D., Fabiana Cristina-Rodrigues, B.Sc, Cláudio C. Filgueiras, Ph.D., Yael Abreu-Villaça, Ph.D.

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

Running title: Nicotine and ethanol withdrawal

Number of pages: 38

Number of Tables: 02

Number of Figures: 06

Abbreviations:

ANOVA, analysis of variance

BrdU, bromodeoxyuridine

FPLSD, Fisher's Protected Least Significant Difference

GrDG, Granular layer of the Dentate Gyrus

Mol, Molecular layer

PN, postnatal day

rANOVA, repeated-measures analysis of variance

TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) to 3'-OH ends of DNA

Corresponding author:

Dr. Yael Abreu-Villaça
Laboratório de Neurofisiologia
Departamento de Ciências Fisiológicas
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Centro Biomédico
Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Av. Prof. Manoel de Abreu 444, 5 andar, Vila Isabel
Rio de Janeiro, RJ, 20550-170, Brazil
Phone: (5521) 2587 6295, Fax: (5521) 2587 6129
E-mail: yael_a_v@yahoo.com.br / yael_a_v@pq.cnpq.br

ABSTRACT

We have recently identified hippocampal cell death and reduced neuronal and glial cells densities during adolescent nicotine and ethanol exposures and outcomes reduced in severity when nicotine and ethanol are co-administered during this developmental period. In the present study, we investigated the effects of adolescent nicotine and/or ethanol withdrawal on the following regions of the hippocampus: Granular layer of the Dentate Gyrus (GrDG), Molecular layer (Mol), CA1, CA2 and CA3. From the 30th to the 45th postnatal day (PN30-PN45), C57BL/6 male and female mice were exposed to nicotine free base (NIC) and/or ethanol (ETOH). Four groups were analyzed: 1) concomitant NIC (50 µg/ml in 2% saccharin to drink) and ETOH (25%, 2 g/kg i.p. injected every other day) exposure; 2) NIC exposure; 3) ETOH exposure; 4) vehicle. We evaluated cell degeneration (TUNEL assay), neuronal and glial densities (optical Disector) and region thicknesses two (PN47) and five (PN50) days post-exposure. On PN47, there were increases in the number of TUNEL+ cells in most hippocampal regions of both ETOH and NIC groups. In the NIC+ETOH group there were less severe effects. These results were paralleled by reductions in neuronal and glial cells densities for all treatment groups. In contrast, on PN50, ethanol and/or nicotine withdrawal were associated with compensatory reductions in TUNEL+ cells in all hippocampal regions. These results were paralleled by a reversal of effects on neuronal and glial densities so that there were no longer differences between groups. There were no effects on region thicknesses. These results suggest that deleterious effects of nicotine and/or ethanol are reversed during prolonged withdrawal.

Keywords. Tobacco; Alcohol; TUNEL; Neuronal density; Glial density; Apoptosis

INTRODUCTION

Tobacco and ethanol are the two most commonly co-used and co-abused drugs. Co-use and co-abuse prevail across ages, however, adolescence is the critical period during which most smokers begin their habit (National Institute on Drug Abuse, 1998, Nelson et al., 1995) and exploratory ethanol use also typically occurs during this developmental period (Spear, 2000). Studies of psychoactive substance use have shown that adolescent drinkers are more likely than nondrinkers to be smokers and vice versa (Chen e Kandel, 1995, Schorling et al., 1994, Torabi et al., 1993). Additionally, in recent decades it has been observed that adolescents are consuming larger quantities of alcohol and cigarettes earlier in life (Perkonigg et al., 2006) and that there is a strong correlation between onset of tobacco consumption at an early age and alcohol addiction, characterizing adolescence as a period of vulnerability (DiFranza e Guerrero, 1990, Grant, 1998a). The relationship between nicotine and ethanol can also be demonstrated during withdrawal. The prevalence of smoking in individuals undergoing treatment for alcohol use disorders is 3 to 4 times higher as compared with that reported for the general population (Batel et al., 1995). Interestingly, to quit drinking is strongly related to success at smoking cessation (Zimmerman et al., 1990). Former or current alcohol abusers are less successful at quitting smoking than the general population (Bobo et al., 1987, Dawson, 2000) and decreases in cigarette consumption as well as smoking cessation have been associated with better drinking outcomes in alcoholism treatment (Friend e Pagano, 2004, Friend e Pagano, 2005). Considering the epidemiological findings described above, a better understanding of the neurobiological substrates affected by these drugs of abuse could be important for a better understanding of the factors that determine the co-use and relapse to drug use.

The associations between tobacco and ethanol could be explained by the cumulative behavioral effects of nicotine and ethanol. In this regard, we have previously shown that nicotine and ethanol interact during adolescence of mice affecting memory/learning (Abreu-Villaça et al., 2007) and anxiety levels (Abreu-Villaça et al., 2008) both during exposure and withdrawal. Considering the role of the hippocampus in both anxiety and memory/learning (for review: (Billard, 2006, Engin e Treit, 2007, Small, 2002), we have also investigated the effects of these drugs on this brain structure. We have identified hippocampal cell death and reduced density of neuronal and glial cells during adolescent nicotine or ethanol exposure while co-administration of nicotine and ethanol resulted in less severe effects (Oliveira-da-Silva et al., 2009). Accordingly, in light of these findings, we suggested that the behavioral effects of exposure represented, at least in part, underlying neurotoxic outcomes in the adolescent hippocampus.

Studies with adolescent nicotine exposure demonstrated that changes in macromolecular constituents indicative of hippocampal cell loss detected during exposure and withdrawal (Abreu-Villaça et al., 2003a). In addition, a late emerging increased expression of apoptosis-related tumor-suppressor gene p53 (13 days of withdrawal) specific to females has been demonstrated (Trauth et al., 2000b). As for ethanol, besides hippocampal damage elicited by ethanol exposure (Milotova et al., 2008b), there is compelling evidence that repeated withdrawals from ethanol present a unique risk for hippocampal-related cognitive impairment and cell damage (White e Swartzwelder, 2004). Considering that the effects of nicotine+ethanol on hippocampal cell damage were only investigated during the period of exposure, the purpose of the current study was to investigate whether adolescent nicotine and/or ethanol withdrawal are associated with altered programmed cell death and whether this results in neuronal and/or glial density and region thicknesses alterations in the hippocampus. In this regard, the present study complements our previous one concerning the effects of nicotine and/or ethanol during exposure (Oliveira-da-Silva et al., 2009).

Regular smokers tend to smoke intermittently in order to maintain blood levels of nicotine above a minimum effective concentration during their active period. Therefore, in keeping with earlier experimental designs (Abreu-Villaça et al., 2006, Abreu-Villaça et al., 2007, Abreu-Villaça et al., 2008, Oliveira-da-Silva et

al., 2009, Ribeiro-Carvalho et al., 2008, Ribeiro-Carvalho et al., 2009), 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. In light of the unique behavioral sensitization due to nicotine and ethanol exposure during adolescence (Abreu-Villaça et al., 2007, Abreu-Villaça et al., 2008), exposure began on postnatal day (PN) 30, which, based on brain development, onset of puberty, and patterns of drug reactivity, represents the early adolescent stage in the rodent, and extended up to PN45, still well within adolescence (Spear, 2000). At two and five days of withdrawal (PN47 and PN50), we evaluated hippocampus cell degeneration with the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay, which visualizes DNA degradation. Neuronal and glial densities were evaluated with the optical Disector method. Finally, hippocampus regions thicknesses were measured.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animal Treatment

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 (Abreu-Villaça et al., 2006, Abreu-Villaça et al., 2007, Abreu-Villaça et al., 2008, Klein et al., 2003, Klein et al., 2004, Oliveira-da-Silva et al., 2009, Ribeiro-Carvalho et al., 2008, Ribeiro-Carvalho et al., 2009, Sparks e Pauly, 1999). All mice were bred and maintained in our laboratory. Animals were derived from a C57BL/6 colony maintained at the Universidade Estadual de Campinas (São Paulo, Brazil) for over 70 generations. The animals were kept in a temperature-controlled room on a 12 h light/dark cycle (lights on at 2:00 am). Access to food and water was *ad lib*. On the first postnatal day (PN1), litters were culled to a maximum of 8 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 35 litters (87 females and 98 males) were individually housed. Single housing may reduce neurogenesis and synaptic plasticity (Lu et al., 2003), 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, the approximate age range during which animals of both genders and most breeding stock exhibit adolescent-typical behavior and particular neurochemical and endocrine patterns when compared to adulthood and prepubertal periods (Spear, 2000). During this period, (-)-nicotine freebase (50 mg/ml) (Sigma, St Louis, MO) in 2% saccharin (used to mask the bitter taste of nicotine) or 2% saccharin only was administered in the drinking water (the sole source of fluid) in order to mimic continuous nicotine consumption; while 25% ethanol (2 g/kg) solution (v/v) in saline or saline only was injected (i.p.) every other day in order to mimic cyclical patterns of alcohol consumption. Male and female mice were distributed into four treatment groups: 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 during the treatment period. 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.

Tissue preparation

Studies were conducted at two time points: Two (PN47) and five (PN50) days after the end of the drug administration period. Mice were deeply anesthetized and transcardially perfused with saline (0.9% NaCl - 3 min), followed by a solution of paraformaldehyde 4% and sucrose 20% for cryoprotection (5 min). The skin was removed and the heads were postfixed overnight by immersion in a solution of paraformaldehyde 4% and sucrose 30%. The brains were then removed from the skulls with the aid of a dissection microscope, placed in a chilled slicing box, embedded in Optical Cut Temperature/Tissue-Tek (Sakura Finetek Inc. Torrance, CA – USA) and frozen in liquid nitrogen. Each brain was sectioned coronally at 25µm using a SLEE/MEV cryostat at -20 °C (SLEE, Mainz – Germany). Two in five sections were thaw-mounted onto gelatinized glass slides. Each first collected section was stained with cresyl violet (Sigma Chemical Co St Louis, MO – USA) by the Nissl method and used to quantify neuronal and glial density. Each second-collected section was used to identify programmed cell death by the TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) to 3'-OH ends of DNA) staining method. Quantitative analyses were performed in the Granular layer of the Dentate Gyrus (GrDG), in the Molecular layer (Mol) and in CA1, CA2 and CA3 regions of hippocampus.

Apoptotic cell death

Visualization of apoptosis-mediated cell degeneration was carried out using TUNEL assays that were performed using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol (PN47: 22 female and 25 male mice from 15 litters; PN50: 23 female and 29 male mice from 20 litters). Briefly, endogenous peroxidase was inactivated by 3% H₂O₂ for 10 min at room temperature. Sections were rinsed with PBS (3 × 5 min), permeabilized with Triton X-100 in 0.5% sodium citrate pH 7.4 for 15 min at room temperature and rinsed with PBS again (3 × 5 min). Sections were then incubated with TUNEL reaction mixture (1:9) for 60 min at 37°C and rinsed with PBS (3 × 5 min). Further incubation with peroxidase-conjugated antibody (1:2) was performed for 30 min at 37°C, followed by PBS rinses. Sections were coverslipped using Entellan neu (Merck Darmstadt, Germany) and examined under the light microscope (Olympus BX40). Apoptotic TUNEL-positive cells (brown-stained) were quantified in three equidistant hippocampal sections of each mouse.

According to Franklin and Paxinos (1996), the hippocampus extends from Bregma coordinates -0.94mm and -4.04mm. In accordance with our previous report (Oliveira-da-Silva et al., 2009), here, the anteroposterior extents of the hippocampal regions to be quantified were selected from within the interval between the Bregma point -2.30mm and -3.52mm (Franklin, KBJ e Paxinos, G, 1996), corresponding to approximately 40% of its full extent. In order to use an easily identifiable landmark to begin quantification, we chose to begin the analyses after the end of the medial habenular nucleus (Bregma -2.30 mm). We also decided to go backward only as far as both CA1 and CA3 fields were easily identifiable (Bregma -3.52 mm). To warrant the correct collection of the brain sections, we began sectioning the brain more rostrally (approximately at Bregma -0.58 mm) and finished sectioning more caudally (approximately at Bregma -5.20 mm). As we approached the Bregma coordinates used for quantification, the sections were collected. The mediolateral locations of the analyzed regions were identified based on cytoarchitectural criteria: the GrDG is a C-shaped structure composed of granule cells, medially located in the Dentate Gyrus. The Mol is a low density layer external to

the GrDG. The CA1, CA2 and CA3 regions are located in the Ammon's horn. The CA1 is dorsally located in the horn. CA3 is ventral. CA2 consists of a narrow field of cells located between the CA1 and CA3 regions (Bailey et al., 2000, Burwell et al., 1995, Miki et al., 2005). In each section, a grid (in the eyepiece) composed of $20 \times 20 \mu\text{m}$ squares was positioned over each hippocampal region (magnification, 400-fold) and apoptotic cells were counted within the frames. The number of squares within which apoptotic cells were counted varied according to the particular morphology of each hippocampal region. As a result, the final areas to be quantified were: GrDG – $16,000 \mu\text{m}^2$; Mol – $40,000 \mu\text{m}^2$; CA1 – $8,000 \mu\text{m}^2$; CA2 – $4,000 \mu\text{m}^2$; CA3 – $12,000 \mu\text{m}^2$.

Neuronal and glial densities

The neuronal and glial densities were estimated using the optical Disector method (Sterio, 1984b) in Nissl-stained sections adjacent to those used to quantify TUNEL-positive cells (PN47: 16 female and 17 male mice from 15 litters; PN50: 17 female and 16 male mice from 20 litters). This method is considered an unbiased and efficient cell counting method by several authors (Gardella et al., 2003, Mandarim-de-Lacerda, 2003). Initially, two parallel planes (look-up and look-down planes), $3 \mu\text{m}$ apart (z-axis) from each other, were selected with the aid of an Olympus BX40 microscope (magnification, 1000-fold). Neuronal and the glial cells densities were determined with the equation $\text{Density} = (Q/t \times At) \text{ mm}^{-3}$ (for details, see: (Sterio, 1984b) where Q is the number of neuronal or glial nuclei in focus only in the look-up plane that did not touch the forbidden line or its extensions, t is the thickness of parallel sections pairs and At is the test area. For each brain, five random Disector pairs were counted for the GrDG, four pairs were counted for the Mol, CA1 and CA3 while two pairs were counted for the CA2. Neurons were distinguished from glial cells because the former have nuclei with distinct nucleoli and a large mean nuclear diameter with a fair amount of chromatin, whereas glial cells have smaller nuclei with little chromatin on a clear background (Abreu-Villaça et al., 2002, Oliveira-da-Silva et al., 2009, Ribeiro-Carvalho et al., 2006). In each section, a grid composed of $15 \times 15 \mu\text{m}$ squares was positioned over each hippocampal region (magnification, 1000-fold) and neurons and glial cells were counted within the frames. The number of squares within which neurons or glial cells were counted varied according to the particular morphology of each hippocampal region. As a result, the final areas to be quantified were: GrDG – $18,000 \mu\text{m}^2$; Mol – $14,400 \mu\text{m}^2$; CA1 – $14,400 \mu\text{m}^2$; CA2 – $7,200 \mu\text{m}^2$; CA3 – $14,400 \mu\text{m}^2$.

Hippocampal thicknesses

Using the same slices in which cell densities were evaluated, analyses of the thicknesses of the different hippocampal regions were performed. As a result, five measurements were made for the GrDG, four for the Mol, CA1 and CA3, and two for the CA2. The thicknesses were measured with the aid of an eyepiece scale adapted to the microscope. The scale was placed perpendicularly in relation to the inner boundary of each of the areas in which measurements were carried out. The average thickness of each region was calculated and the results were used in the data analysis.

Data analysis of the effects on fluid intake/body weight and body weight

Initially, repeated-measures analyses of variance (rANOVA) on each variable (fluid intake/body weight and body weight) were carried out. Treatment and Sex were used as between-subjects factors. Day was considered the within-subjects factor. Whenever significant Treatment interactions were detected, lower order ANOVAs followed by pairwise post-hoc analyses (Fisher's Protected Least Significant Difference - FPLSD) were carried out. Where Treatment effects did not interact with other variables, only the main effect was interpreted.

Data analysis of hippocampal regions

To reduce the likelihood of type 1 statistical errors that might result from repeated testing of the global data set, for each group of data (number of TUNEL-positive cells, neuronal density, glial density and region thickness), we first performed a global rANOVA on all factors (Treatment, Age and Sex) utilizing log-transformation because of the heterogeneous variance among the different regions. The Hippocampal Regions (GrDG, Mol, CA1, CA2 and CA3) were treated as repeated measures, since each was obtained from the same brain. Whenever these initial tests indicated treatment effects that differed among different regions, ages and sexes, data were then examined separately using lower-order ANOVAs followed by pairwise post-hoc analyses (FPLSD). For all cases in which treatment effects did not interact with other variables, only the main effect was recorded, without testing of individual differences.

Data analysis of nicotine-ethanol interactions

The one-dimensional statistical design described above, in which Treatment (VEH, ETOH, NIC 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 was also used (Abreu-Villaça et al., 2004a, Abreu-Villaça et al., 2004b, Abreu-Villaça et al., 2007, Abreu-Villaça et al., 2008, Oliveira-da-Silva et al., 2009, Rhodes et al., 2003a, Ribeiro-Carvalho et al., 2008, Ribeiro-Carvalho et al., 2009). 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 additive effects do not show significant interactions.

General aspects of the data analysis

Significance was assumed at the level of $P < 0.05$ for main effects; however, for interactions at $P < 0.1$, we also examined whether lower-order main effects were detectable after subdivision of the interactive variables (Snedecor, GW e Cochran, WG, 1967). Data are compiled as means and standard errors.

RESULTS

Effects on fluid intake/body weight and body weight (Fig. 1)

Treatment did not affect (no effect or interactions) either the increase in Fluid intake/body weight (Day: F 14,1974 = 16.9, $P < 0.001$) nor the body weight gain (Females – Day: F 14,868 = 160.4, $P < 0.001$; Males – Day: F 14,1106 = 290.4, $P < 0.001$) that were quantified throughout the exposure period.

Apoptotic cell death

The global rANOVA, using the one-dimensional design (four levels: VEH, ETOH, NIC and NIC+ETOH) across treatments, hippocampal regions, ages and sexes identified a significant Treatment effect and Treatment $\times$ Hippocampal Regions $\times$ Age interactions (Table 1). Similarly, with nicotine and ethanol treatments considered as separate factors in a two-dimensional design, we found that the two dimensions interacted with each other, with Hippocampal Regions and with Age (Table 1). Given these results, subsequent data analyses were carried out separately on each hippocampal region and on each age and then the results were reexamined. There were no Treatment interactions with Sex.

TUNEL-positive cells were identified in all hippocampal regions of VEH mice, which confirms previous findings of apoptotic cell death during adolescence (Uysal et al., 2005). On PN47, one-dimensional ANOVAs identified significant Treatment effects on all hippocampal regions (GrDG: F 3,39 = 18.8, $P < 0.001$; Mol: F 3,39 = 30.0, $P < 0.001$; CA1: F 3,39 = 14.8, $P < 0.001$; CA2: F 3,39 = 7.3, $P < 0.001$ and CA3: F 3,39 = 21.4, $P < 0.001$). *Post-hoc* analyses (Figs. 2A and 3) indicated that ethanol withdrawal was associated with an increased number of apoptotic cells relative to the VEH group in all hippocampal regions. Nicotine withdrawal was associated with less severe region-dependent effects: the number of TUNEL-positive cells was significantly increased in the GrDG, Mol, CA1 and CA3 when compared to the VEH group; no differences were observed regarding CA2. NIC+ETOH withdrawal was related to an increased number of TUNEL-positive cells when compared to the VEH group only in the Molecular layer. These less severe effects regarding NIC+ETOH withdrawal were confirmed by the two-dimensional analysis (Nicotine and Ethanol treatments considered as separate factors in the ANOVA). We found Nicotine $\times$ Ethanol interactions for all hippocampal regions: GrDG (F 1,39 = 48.0, $P < 0.001$), Mol (F 1,39 = 55.9, $P < 0.001$); CA1 (F 1,39 = 36.4, $P < 0.001$), CA2 (F 1,39 = 8.1, $P = 0.007$) and CA3 (F 1,39 = 40.3, $P < 0.001$), indicative of less-than-additive effects of the combined nicotine-ethanol exposure.

On PN50, one-dimensional ANOVAs also indicated significant Treatment effects on all hippocampal regions (GrDG: F 3,44 = 14.9, $P < 0.001$; Mol: F 3,44 = 12.3, $P < 0.001$; CA1: F 3,44 = 4.5, $P = 0.008$; CA2: F 3,44 = 5.5, $P = 0.003$ and CA3: F 3,44 = 4.7, $P = 0.006$). However, in a clear contrast to results found on PN47, at the fifth day of nicotine and/or ethanol withdrawal, there were reductions in apoptotic cell number relative to the VEH group (Fig 2B and 3). The ETOH group presented reduced TUNEL-positive cells in the GrDG, CA1, CA2 and CA3. There were no significant alterations in the Mol layer. At five days of nicotine withdrawal, there were significant reductions in all regions when compared to the VEH group. The same pattern of results was identified for the NIC+ETOH group. For the GrDG, Mol and CA1 regions, the effects were smaller than the summation of nicotine and ethanol individual effects (less-than-additive effect: Nicotine $\times$ Ethanol interaction in the GrDG: F 1,44 = 9.04, $P = 0.004$; Mol: F 1,44 = 3.2, $P < 0.08$ and CA1: F 1,44 = 3.1,

P=0.08). As for the CA2 and CA3 regions, the two-dimensional design indicated no significant interactions of Nicotine $\times$ Ethanol, connoting the fact that the effects of the combined exposure were undistinguishable from simple additivity of the effects of nicotine and ethanol.

Neuronal densities

The one-dimensional global rANOVAs on Neuronal density indicated a significant Treatment effect and Treatment $\times$ Hippocampal Regions $\times$ Age interactions. With nicotine and ethanol treatments considered as separate factors in a two-dimensional design, we found that the two dimensions interacted with each other (Nicotine $\times$ Ethanol) and were also interactive with Hippocampal Regions and Age (Table 1). Given these results, subsequent data analyses were carried out separately on each hippocampal region and each age and then the results were reexamined. Nicotine and Ethanol treatments were also interactive with Sex, so, after subdividing the data by region and age, we kept this variable in the analysis to see if treatment interactions remained detectable.

On PN47, one-dimensional ANOVAs on each hippocampal region identified significant Treatment effects for Mol: (F 3,25 = 17.0, $P < 0.001$), CA1 (F 3,25 = 7.9, $P < 0.001$), CA2 (F 3,25 = 3.7, $P = 0.03$) and CA3 (F 3,25 = 10.3, $P < 0.001$). *Post-hoc* analyses on each region indicated a decrease in neuronal density during NIC, ETOH and combined NIC+ETOH withdrawal when compared to VEH mice (Fig. 4A). Treatment effects for GrDG were close to significant (F 3,25 = 2.53, $P = 0.09$). With Nicotine and Ethanol treatments considered as two dimensions, we found region-dependent effects: There were significant Nicotine $\times$ Ethanol interactions for Mol (F 1,25 = 44.7, $P < 0.001$), and CA3 (F 1,25 = 3.4, $P = 0.07$) regions thus indicating less than additive effects during Nicotine and Ethanol withdrawal. In contrast, for CA1 and CA2, the ANOVAs did not show significant interactions between these factors, connoting the fact that the effects observed during NIC+ETOH withdrawal were undistinguishable from simple additivity of the effects of nicotine and ethanol.

On PN50, differences among treatment groups were no longer detectable (no effects or interactions on any region) (Fig. 4B).

Glial densities

Similarly to neuronal data, the global rANOVAs on glial density indicated a significant Treatment effect and Treatment interactions with Hippocampal Regions and Age. All factors were also interactive with Sex. In addition, the two dimensions (Ethanol and Nicotine treatments) interacted with each other, with Hippocampal Regions and with Age (Table 1). Considering the interactions described above, subsequent data analyses were carried out separately on each hippocampal region and age and then the results were reexamined. The factor Sex was kept in the analyses.

On PN47, one-dimensional ANOVAs on each hippocampal region identified significant treatment effects for Mol: (F 3,25 = 14.5, $P < 0.001$), CA1 (F 3,25 = 7.9, $P < 0.001$), CA2 (F 3,25 = 7.7, $P < 0.001$) and CA3 (F 3,25 = 12.0, $P < 0.001$). *Post-hoc* analyses indicated a decrease in glial density during NIC, ETOH and combined NIC+ETOH withdrawal when compared to VEH mice (Fig. 5A). There were no treatment effects for GrDG (F 3,25 = 1.9, $P = 0.15$). Considering Ethanol and Nicotine treatments as two separable factors, we again found region-dependent effects: The ANOVAs indicated Nicotine $\times$ Ethanol interactions for Mol (F 1,25 = 36.2, $P < 0.001$) CA2 (F 1,25 = 2.9, $P = 0.09$) and CA3 (F 1,25 = 4.5, $P = 0.04$) regions, thus indicating less than additive effects associated with Nicotine and Ethanol withdrawal. In contrast, for CA1, there was no significant Nicotine $\times$ Ethanol interaction, indicating additive effects.

On PN50, there were no significant alterations (no effects or interactions on any region) (Fig. 5B).

Glia/Neuron ratios

Glia/Neuron ratios varied depending on the Region ($F_{4,100} = 3.7$, $P=0.008$). However, the ratios were not affected during nicotine and/or ethanol withdrawal (Table 2).

Hippocampal thicknesses

The thicknesses of the different hippocampal regions were not affected during nicotine and/or ethanol withdrawal: neither the one- nor the two-dimensional analyses indicated any effects or interactions (Fig. 6).

DISCUSSION

Results obtained in the current study extend previous findings which demonstrated that nicotine and/or ethanol adolescent exposure elicit hippocampal cell damage (Oliveira-da-Silva et al., 2009). Our current findings are consistent with the view that the deleterious effects elicited by nicotine, ethanol or nicotine+ethanol exposures are reversed during the course of withdrawal.

Methodological issues

We have recently shown that the nicotine concentration used in the drinking solution in the present study generates cotinine (nicotine metabolite) serum levels of 128 ng/ml (Ribeiro-Carvalho et al., 2009) which are within the range of values found in adolescent smokers (Caraballo et al., 2004, Wood et al., 2004). Additionally, the dose of ethanol used here generates ethanol serum levels of 137 mg/dL (Ribeiro-Carvalho et al., 2009) that are within the range of values that a human adolescent would present after ingestion of a moderate dose of ethanol (Eckardt et al., 1998). These results show that the experimental design used here and in previous works (Abreu-Villaça et al., 2006, Abreu-Villaça et al., 2007, Abreu-Villaça et al., 2008, Manhães et al., 2008, Oliveira-da-Silva et al., 2009, Ribeiro-Carvalho et al., 2008, Ribeiro-Carvalho et al., 2009) can simulate the pattern of nicotine and ethanol exposure observed for human adolescents.

Nicotine and ethanol pharmacokinetic interactions could affect the results of the combined exposure. Recent data from our laboratory using the same pattern of exposure show that cotinine serum levels do not differ between NIC and NIC+ETOH exposed mice and, in the same way, ethanol levels do not differ between ETOH and NIC+ETOH mice (Ribeiro-Carvalho et al., 2009). Our results are in line with those of previous studies, which have demonstrated that i.p. ethanol concentrations are not affected by chronic nicotine exposure (Parnell et al., 2006) and that nicotine exposure does not affect the elimination rate of ethanol (Collins et al., 1988). Accordingly, it is unlikely that pharmacokinetic nicotine–ethanol interactions alone can explain the current findings.

The TUNEL staining at one time point, as performed in the present study, labels cells that died up to 48 hours prior to sacrifice, since this is the period during which apoptotic cells persist in the organism (Crews et al., 2000, Switzer, III, 2000). Accordingly, the effects described on PN47 could be either due to drug exposure or due to a mix of effects of drug exposure and withdrawal. In contrast, cell death as quantified later during withdrawal (PN50) more likely reflects withdrawal effects only. Interestingly, the comparison between cell damage detected during nicotine and ethanol exposure (Oliveira-da-Silva et al., 2009) and during withdrawal (present paper) indicates more severe effects during exposure: Cell death is still detected two days post-exposure; however, the magnitude of the effects are clearly reduced. For example, ETOH-elicited increase in cell death during exposure varied from 120% to 140% depending on the hippocampal region, while at two days post-exposure, the increase ranged from 45% to 65%. Within five days of withdrawal, nicotine

and/or ethanol mice presented reduced numbers of TUNEL-positive cells when compared to VEH mice. Altogether, these results suggest that damage is reversed, at least in part, during the course of withdrawal.

Despite the fact that the TUNEL staining is not able to label the totality of cells that die during the exposure period and withdrawal, by quantifying neuronal and glial cell densities at each of the time points (PN47 and PN50), we were able to reveal the outcomes from the summation of the whole exposure period and withdrawal. Accordingly, the combined techniques allowed for the identification of the increase in apoptotic cell death as responsible, at least in part, for the reduced neuronal and glial densities detected at two days of withdrawal. Glia/Neuron ratios for the hippocampal regions were not affected by nicotine and/or ethanol treatments, which indicated that these cell populations were equally affected by these drugs. In addition, the reduction in cell densities associated with comparatively normal thicknesses of hippocampal regions suggest that nicotine and/or ethanol treatments result in a reduced number of neuronal and glial cells in these regions within two days of withdrawal. In contrast, at five days of withdrawal, the decrease in cell death contributed to the recovery of the neuronal and glial cell populations. Even though we did not check this possibility, as described below, there is evidence that modifications in the rate of neurogenesis and gliogenesis also play a role in density results.

Hippocampal Cell Damage during the Course of Ethanol Withdrawal

In our study, TUNEL staining revealed a substantial number of apoptotic cells in GrDG, Mol, CA1, CA2 and CA3 within two days of ethanol withdrawal, which indicates that the neurotoxic effect of ethanol is not limited to any particular hippocampal field, but unselectively affects several hippocampal areas. Ethanol is a glutamatergic antagonist so that it decreases N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated Ca^{2+} flux (Vengeliene et al., 2008). This effect, which leads to decreased CREB activation and secondary decrease in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was shown to elicit apoptosis (Crews e Nixon, 2009, Zou e Crews, 2006). It should be mentioned that the intermittent (every other day) ethanol exposure, as performed in the present study, necessarily produces repeated ethanol withdrawals, which in contrast to ethanol exposure, elicits a compensatory excitotoxic activation of NMDA receptors (Gibson et al., 2003, Harper e Matsumoto, 2005), possibly contributing to the cell damage we observed here. In this regard, in a previous study in which we used the same model of ethanol exposure during adolescence (Oliveira-da-Silva et al., 2009), we found similar effects, but of larger magnitude, by the end of the period of intermittent exposure. These results confirm that adolescence is a period in which the brain is still sensitive to ethanol and also suggests that with persistence of withdrawal, the mechanisms responsible for triggering apoptosis are weakened. In fact, five days after the end of adolescent exposure in ETOH mice, the number of cells undergoing apoptosis is even reduced in most hippocampal regions when compared to the VEH group, which suggests a compensatory response to cell damage. This compensatory response should be responsible, at least in part, for the recovery in both neuronal and glial cells densities that occur during the course of withdrawal. However, altered neurogenesis and gliogenesis may also play a role. In this regard, previous reports have shown that chronic ethanol exposure of organotypic hippocampal cultures is associated with reduced bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (indicative of reduced cell replication) and neuronal and glial cells loss, but that, within a few days of withdrawal, both BrdU incorporation and expression of neuronal and glial markers return to control levels (Wilkins, Jr. et al., 2006). Withdrawal from postnatal (Helfer et al., 2009) and adult (He et al., 2009) ethanol administration were also shown to elicit increased number of newly generated cells in brain regions such as the hippocampus and cerebral cortex.

Hippocampal Cell Damage during the Course of Nicotine Withdrawal

As for nicotine, Berger and collaborators (Berger et al., 1998) have shown that it has a cytotoxic effect in hippocampal progenitor cells. Regarding adolescent exposure, Jang and collaborators (Jang et al., 2002a) have demonstrated that nicotine increases the number of TUNEL-positive cells in the Dentate Gyrus of rats. In addition, nicotine exposure during this developmental period causes changes indicative of brain cell damage in the hippocampus and other brain regions that persist during withdrawal (Abreu-Villaça et al., 2003b, Abreu-Villaça et al., 2004b). These results lend support to the proposal that adolescents show a peculiar sensitivity to nicotine. As an acetylcholine analog, the ionotropic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are the primary cellular mediators of nicotine's effects. Nicotine-elicited nAChRs upregulation is more robust in adolescent rats as compared to adults. In addition, upregulation persists for a few days after the end of exposure (Abreu-Villaça et al., 2003a, Doura et al., 2008, Miao et al., 1998, Ribeiro-Carvalho et al., 2009, Slotkin et al., 2004).

While the activation of nAChRs serves a trophic role in neurodevelopment (Coronas et al., 2000, Hohmann e Berger-Sweeney, 1998, Pugh e Margiotta, 2000), excessive cholinergic stimulation disrupts normal patterns of cell replication, differentiation and synaptogenesis (Levin,ED e Slotkin,TA. 1998, Slotkin, 2002, Slotkin, 2004), progressing at high levels to cell damage (Abreu-Villaça et al., 2003b, Abrous et al., 2002, Slotkin, 2002, Slotkin, 2004). Developing cells may also be less capable of buffering calcium than mature cells; thus, the neurotoxic effects of nicotine may be due to its ability to increase nAChRs-mediated Ca^{2+} influx, coupled with incomplete calcium buffering (for review: (Picciotto e Zoli, 2008a), both contributing to trigger the programmed cell death pathway. Interestingly, the pattern of nicotine-elicited upregulation of nAChRs matches that of cell death, which corroborates the hypothesis described above: Upregulation occurs during exposure and fades during the course of withdrawal (Abreu-Villaça et al., 2003a, Doura et al., 2008, Ribeiro-Carvalho et al., 2008, Ribeiro-Carvalho et al., 2009, Trauth et al., 1999); in parallel, nicotine-elicited cell death (Oliveira-da-Silva et al., 2009) is still detectable two days post-exposure, disappearing five days post-exposure. Nicotine-elicited cell death is associated with reduced neuronal and glial cell numbers during exposure (Oliveira-da-Silva et al., 2009) and here we show neuronal and glial cells density reductions within two days of withdrawal. Our results indicate that, as described for ethanol, increased cell death plays a role in these outcomes, but there is also evidence that nicotine exposure decreases cell replication in the hippocampus (Abrous et al., 2002, Scerri et al., 2006). Within five days of nicotine withdrawal, the mechanisms that explain the reduced number of cells undergoing apoptosis are not clear, however, nicotine was shown to upregulate mRNA expression of growth factors in the postnatal rat hippocampus (Son e Winzer-Serhan, 2009a), which is hypothesized to reduce programmed cell death (Huang e Reichardt, 2001). If a similar effect occurs during withdrawal, it would explain the reduced number of apoptotic cells and, at least in part, the recovery of neuronal and glial cell densities described in the present study.

Hippocampal Cell Damage During the Course of Combined Ethanol-Nicotine Withdrawal

Two days after the cessation of exposure, adolescent mice that received the combined nicotine and ethanol treatment failed to present significant increases in the number of apoptotic cells when compared to the VEH group in most hippocampal regions, which is indicative of less-than-additive effects of nicotine and ethanol. Within five days of withdrawal, there were even compensatory reductions in the number of apoptotic cells in all hippocampal regions. The exact mechanisms that explain nicotine+ethanol interactions still need to be elucidated, however, actions of nicotine that seem to have a role mediating its neuroprotective effects against other neurotoxins, such as activation of fibroblast growth factor (Belluardo et al., 2000), inactivation of L-type calcium channels (Stevens et al., 2003a) and decreased caspase 3 activation (Liu e Zhao, 2004), may

play a role. Nicotine can prevent cell death from a number of neurotoxic insults, including excitotoxicity possibly by modulating Ca^{2+} signaling, which may alter subsequent responses to this ion (for review: (Picciotto e Zoli, 2008b)). In fact, nicotine has been shown to inhibit ethanol-induced neurotoxicity in cultured cortical and cerebellar cells (Tizabi et al., 2003, Tizabi et al., 2004). Despite the above mentioned findings, nicotine+ethanol deleterious effects on neuronal and glial densities during a two-day withdrawal were significant. There are two possibilities to explain the reduced densities not accompanied by cell death during withdrawal: First, increased cell death may have occurred earlier during exposure so that, at two days of withdrawal, both neuronal and glial densities reductions were detected. In this regard, our previous study using the same animal model of combined exposure failed to find increased apoptosis by the end of the exposure period (Oliveira-da-Silva et al., 2009), therefore if there is in fact increased apoptosis, this might have occurred earlier during exposure. Second, these drugs negatively affect neurogenesis and gliogenesis in the hippocampus, which would be responsible, at least in part, for the reduced densities detected both by the end of exposure (Oliveira-da-Silva et al., 2009) and within two days of withdrawal. This hypothesis is in agreement with earlier observations (Abrous et al., 2002, Crews et al., 2006, Shingo e Kito, 2005, Wilkins, Jr. et al., 2006).

Combined ethanol-nicotine prolonged withdrawal was associated with a reversal of effects on neuronal and glial densities so that five days post-exposure there were no longer differences between groups. As for ETOH and NIC mice, the reduced number of apoptotic cells contributed to the reversal of effects and it is also possible that other events such as increased neurogenesis and/or gliogenesis play a role. To our knowledge, this is the first report that demonstrates that deleterious effects of nicotine+ethanol exposure are reversed with prolonged withdrawal.

Final Remarks

The recovery in cell damage described in the present study may have functional consequences since the hippocampus plays a role in both anxiety and memory/learning processes (for review: (Billard, 2006, Engin e Treit, 2007, Small, 2002)). In this regard, cell death and cell density results are paralleled by previous findings which demonstrated that detrimental effects of nicotine and/or ethanol on memory/learning during adolescent exposure fail to persist during withdrawal (Abreu-Villaça et al., 2007). Distinctively, the present results do not seem to play a major role in anxiety results since we have previously shown a female-only anxiogenic response associated with five-days of nicotine and/or ethanol withdrawal (Abreu-Villaça et al., 2008). It is possible that the recovery in neuronal and glial cells numbers described here does not promote a complete recovery in hippocampal function. The present study provides experimental evidence for interactions between nicotine and ethanol withdrawal in the regulation of neuronal and glial cells number in the hippocampus of adolescent mice. Future studies should be carried out in order to verify whether more subtle hippocampal alterations are relevant to behavioral outcomes.

ACKNOWLEDGEMENTS

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 a fellowship from Sub-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR2-UERJ).

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 – Body weight of male (A) and female (B) mice, and fluid intake/body weight collapsed across sexes (C) throughout the exposure period (PN30-PN45). Values are means+SEM. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC+ETOH, combined nicotine -ethanol exposure group.

Fig. 2 – Effects of nicotine and/or ethanol withdrawal on cell death as revealed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay two (A) and five (B) days post-exposure. Values are means+SEM. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC+ETOH, combined nicotine-ethanol exposure group. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs vehicle group as revealed by FPLSD.

Fig. 3 – Representative photomicrographs of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)-stained sections through the CA1 hippocampus region from mice two (PN47) and five (PN50) days post-exposure. Black arrows indicate TUNEL-positive cells. VEH, vehicle mouse; NIC, nicotine exposed mouse; ETOH, ethanol exposed mouse; NIC+ETOH, nicotine+ethanol exposed mouse.

Fig. 4 – Effects of nicotine and/or ethanol withdrawal on neuronal density two (A) and five (B) days post-exposure. Values are means+SEM. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC+ETOH, combined nicotine-ethanol exposure group. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs vehicle group as revealed by FPLSD.

Fig. 5 – Effects of nicotine and/or ethanol withdrawal on glial density two (A) and five (B) days post-exposure. Values are means+SEM. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC+ETOH, combined nicotine-ethanol exposure group. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs vehicle group as revealed by FPLSD.

Fig. 6 – Effects of adolescent nicotine and/or ethanol withdrawal on hippocampal regions thicknesses two (A) and five (B) days post-exposure. Values are means+SEM. VEH, vehicle group; NIC, nicotine exposure group; ETOH, ethanol exposure group; NIC+ETOH, combined nicotine-ethanol exposure group.

REFERENCES

- Abreu-Villaça Y, Medeiros AH, Lima CS, Faria FP, Filgueiras CC, Manhães AC (2007) Combined Exposure to Nicotine and Ethanol in Adolescent Mice Differentially Affects Memory and Learning during Exposure and Withdrawal. *Behavioural Brain Research* 181:136-146.
- Abreu-Villaça Y, Nunes F, Queiroz-Gomes FE, Manhães AC, Filgueiras CC (2008) Combined Exposure to Nicotine and Ethanol in Adolescent Mice Differentially Affects Anxiety Levels during Exposure, Short Term and Long Term Withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 33:599-610.
- Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes FE, Dal Monte AP, Filgueiras CC, Manhães AC (2006) Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57Bl/6 mice. *Behavioral Brain Research* 167:175-82.
- Abreu-Villaça Y, Seidler F, Slotkin TA (2004) Does Prenatal Nicotine Exposure Sensitize the Brain to Nicotine-Induced Neurotoxicity in Adolescence? *Neuropsychopharmacology* 29:1440-50.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Slotkin TA (2003a) 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* 988:164-172.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Tate CA, Slotkin TA (2003b) Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Res* 979:114-128.
- Abreu-Villaça Y, Silva WC, Manhaes AC, Schmidt SL (2002) The effect of corpus callosum agenesis on neocortical thickness and neuronal density of BALB/cCF mice. *Brain Res Bull* 58:411-416.
- Abrous DN, Adriani W, Montaron MF, Aurousseau C, Rougon G, Le Moal M, Piazza PV (2002) Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci* 22:3656-3662.
- Bailey CH, Giustetto M, Huang YY, Hawkins RD, Kandel ER (2000) Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory? *Nat Rev Neurosci* 1:11-20.
- Batel P, Pessione F, Maitre C, Rueff B (1995) Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction* 90:977-980.
- Belluardo N, Mudo G, Blum M, Fuxe K (2000) Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav Brain Res* 113:21-34.
- Berger F, Gage FH, Vijayaraghavan S (1998) Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci* 18:6871-6881.
- Billard JM (2006) Ageing, hippocampal synaptic activity and magnesium. *Magnes Res* 19:199-215.
- Bobo JK, Gilchrist LD, Schilling RF2, Noach B, Schinke SP (1987) Cigarette smoking cessation attempts by recovering alcoholics. *Addict Behav* 12:209-215.
- Burwell RD, Witter MP, Amaral DG (1995) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5:390-408.

- Caraballo RS, Giovino GA, Pechacek TF (2004) Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine Tob Res* 6:19-25.
- Chen K, Kandel DB (1995) The natural history of drug use from adolescence to the mid-thirties in a general population sample. *Am J Public Health* 85:41-47.
- Collins AC, Burch JB, de Fiebre CM, Marks MJ (1988) Tolerance to and cross tolerance between ethanol and nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 29:365-73.
- Coronas V, Durand M, Chabot JG, Jourdan F, Quirion R (2000) Acetylcholine induces neuritic outgrowth in rat primary olfactory bulb cultures. *Neuroscience* 98:213-219.
- Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo G, Wheeler M, Zou J (2006) Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 30:720-730.
- Crews FT, Braun CJ, Hoplight B, Switzer Rc3, Knapp DJ (2000) Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcsm Clin Exp Res* 24:1712-1723.
- Crews FT, Nixon K (2009) Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol* 44:115-127.
- Dawson DA (2000) Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend* 59:235-49.
- DiFranza JR, Guerrera MP (1990) Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol* 51:130-5.
- Doura MB, Gold AB, Keller AB, Perry DC (2008) Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res* 1215:40-52.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B (1998) Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 22:998-1040.
- Engin E, Treit D (2007) The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behavioural Pharmacology* 18:365-374.
- Franklin KBJ, Paxinos G (1996) *The mouse brain in Stereotaxic coordinates*: Academic Press.
- Friend KB, Pagano ME (2004) Smoking initiation among nonsmokers during and following treatment for alcohol use disorders. *J Subst Abuse Treat* 26:219-224.
- Friend KB, Pagano ME (2005) Smoking cessation and alcohol consumption in individuals in treatment for alcohol use disorders. *J Addict Dis* 24:61-75.
- Gardella D, Hatton WJ, Rind HB, Rosen GD, von Bartheld CS (2003) Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *J Neurosci Methods* 124:45-59.
- Gibson DA, Harris BR, Prendergast MA, Hart SR, Blanchard JA, Holley RC, Pedigo NW, Littleton JM (2003) Polyamines contribute to ethanol withdrawal-induced neurotoxicity in rat hippocampal slice cultures through interactions with the NMDA receptor. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1099-1106.

- Grant BF (1998) 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* 10:59-73.
- Harper C, Matsumoto I (2005) Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 5:73-78.
- He J, Overstreet DH, Crews FT (2009) Abstinence from moderate alcohol self-administration alters progenitor cell proliferation and differentiation in multiple brain regions of male and female p rats. *Alcohol Clin Exp Res* 33:129-138.
- Helfer JL, Calizo LH, Dong WK, Goodlett CR, Greenough WT, Klintsova AY (2009) Binge-like postnatal alcohol exposure triggers cortical gliogenesis in adolescent rats. *J Comp Neurol* 514:259-271.
- Hohmann CF, Berger-Sweeney J (1998) Cholinergic regulation of cortical development and plasticity: new twists to an old story. *Perspect Dev Neurobiol* 5:401-425.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, Kim EH, Kim CJ (2002) Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport* 13:1509-1513.
- Klein LC, Stine MM, Vandenberg DJ, Whetzel CA, Kamens HM (2004) Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacol Biochem Behav* 78:13-25.
- Levin ED, Slotkin TA (1998) Developmental neurotoxicity of nicotine. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology* (Slikker W, Chang LW, eds), pp 587-615 San Diego: Academic Press.
- Liu Q, Zhao B (2004) Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Br J Pharmacol* 141:746-754.
- Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L (2003) Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol* 183:600-609.
- Manhães AC, Guthierrez MC, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y (2008) Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 193:216-224.
- Miki T, Satriotomo I, Li HP, Matsumoto Y, Gu H, Yokoyama T, Lee KY, Bedi KS, Takeuchi Y (2005) Application of the physical disector to the central nervous system: estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus. *Anat Sci Int* 80:153-162.
- Milotova M, Riljak V, Jandova K, Bortelova J, Maresova D, Pokorny J, Langmeier M (2008) Changes of hippocampal neurons after perinatal exposure to ethanol. *Physiol Res* 57:275-282.
- National Institute on Drug Abuse. National Institute on Drug Abuse (NIDA) (1998) *The science of Drug Abuse & Addiction*.
- Nelson DE, Giovino GA, Shopland DR, Mowery PD, Mills SL, Eriksen MP (1995) Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *Am J Public Health* 85:34-40.

- Oliveira-da-Silva A, Vieira FB, Cristina-Rodrigues F, Filgueiras CC, Manhaes AC, breu-Villaca Y (2009) Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int J Dev Neurosci* 27:539-548.
- Parnell SE, West JR, Chen WJ (2006) Nicotine decreases blood alcohol concentrations in adult rats: a phenomenon potentially related to gastric function. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1408-1413.
- Perkonig A, Pfister H, Hofler M, Frohlich C, Zimmermann P, Lieb R, Wittchen HU (2006) Substance use and substance use disorders in a community sample of adolescents and young adults: incidence, age effects and patterns of use. *Eur Addict Res* 12:187-196.
- Picciotto MR, Zoli M (2008) Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease. *Front Biosci* 13:492-504.
- Pugh PC, Margiotta JF (2000) Nicotinic acetylcholine receptor agonists promote survival and reduce apoptosis of chick ciliary ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci* 15:113-122.
- Rhodes MC, Seidler FJ, Abdel-Rahman A, Tate CA, Nyska A, Rincavage HL, Slotkin TA (2003) Terbutaline is a developmental neurotoxicant: effects on neuroproteins and morphology in cerebellum, hippocampus and somatosensory cortex. *J Pharmacol Exp Ther*:submitted.
- Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y (2008) Nicotine and ethanol interact during adolescence: Effects on the central cholinergic systems. *Brain Res* 1232:48-60.
- Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Medeiros AH, Siqueira NR, Filgueiras CC, Manhaes AC, breu-Villaca Y (2009) Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience* 162:1174-1186.
- Ribeiro-Carvalho A, Manhaes AC, breu-Villaca Y, Filgueiras CC (2006) Early callosal absence disrupts the establishment of normal neocortical structure in Swiss mice. *Int J Dev Neurosci* 24:15-21.
- Scerri C, Stewart CA, Breen KC, Balfour DJ (2006) The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 184:540-546.
- Schorling JB, Gutgesell M, Klas P, Smith D, Keller A (1994) Tobacco, alcohol and other drug use among college students. *J Subst Abuse* 6:105-115.
- Shingo AS, Kito S (2005) Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons. *J Neural Transm* 112:1475-1478.
- Slotkin TA (2002) Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol Teratol* 24:369-384.
- Slotkin TA (2004) Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198:132-151.
- Slotkin TA, Cousins MM, Seidler FJ (2004) Administration of nicotine to adolescent rats evokes regionally selective upregulation of CNS alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res* 1030:159-163.
- Snedecor GW, Cochran WG (1967) *Statistical Methods*. Ames, Iowa: Iowa State University Press.

- Son JH, Winzer-Serhan UH (2009) Chronic neonatal nicotine exposure increases mRNA expression of neurotrophic factors in the postnatal rat hippocampus. *Brain Res* 1278:1-14.
- Sparks JA, Pauly JR (1999) Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57B1/6 mice. *Psychopharmacology* 141:145-153.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417-463.
- Sterio DC (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134(Pt 2):127-136.
- Stevens TR, Krueger SR, Fitzsimonds RM, Picciotto MR (2003) Neuroprotection by nicotine in mouse primary cortical cultures involves activation of calcineurin and L-type calcium channel inactivation. *J Neurosci* 23:10093-10099.
- Switzer RC 3rd (2000) Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. *Toxicol Pathol* 28:70-83.
- Tizabi Y, Al-Namaeh M, Manaye KF, Taylor RE (2003) Protective effects of nicotine on ethanol-induced toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Neurotox Res* 5:315-321.
- Tizabi Y, Manaye KF, Smoot DT, Taylor RE (2004) Nicotine inhibits ethanol-induced toxicity in cultured cerebral cortical cells. *Neurotox Res* 6:311-6.
- Torabi MR, Bailey WJ, Majd-Jabbari M (1993) Cigarette smoking as a predictor of alcohol and other drug use by children and adolescents: Evidence of the 'Gateway Drug Effect'. *J Sch Health* 63:302-306.
- Trauth JA, Seidler FJ, Slotkin TA (2000) Persistent and delayed behavioral changes after nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res* 880:167-172.
- Uysal N, Tugyan K, Kayatekin BM, Acikgoz O, Bagriyanik HA, Gonenc S, Ozdemir D, Aksu I, Topcu A, Semin I (2005) The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett* 383:241-245.
- Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol* 154:299-315.
- White AM, Swartzwelder HS (2004) Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. *Ann N Y Acad Sci* 1021:206-20.
- Wilkins LH, Jr., Prendergast MA, Blanchard J, Holley RC, Chambers ER, Littleton JM (2006) Potential value of changes in cell markers in organotypic hippocampal cultures associated with chronic EtOH exposure and withdrawal: comparison with NMDA-induced changes. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1768-1780.
- Wood T, Wewers ME, Groner J, Ahijevych K (2004) Smoke constituent exposure and smoking topography of adolescent daily cigarette smokers. *Nicotine Tob Res* 6:853-62.
- Zimmerman EF, Scott WJ, Jr., Collins MD (1990) Ethanol-induced limb defects in mice: effect of strain and Ro15-4513. *Teratology* 41:453-462.

Zou J, Crews F (2006) CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol* 26:385-405.

Table 1 – Global statistical analyses

Apoptosis			
One-dimensional analyses		Two-dimensional analyses	
Treatment	F 3,83=11.0, P<0.001	Nicotine×Ethanol	F 1,83=8.5, P=0.004
Treatment×Region	F 12,332=2.4, P=0.004	Nicotine×Ethanol×Region	F 4,332=2.8, P<0.03
Treatment×Age	F 3,83=11.3, P<0.001	Nicotine×Ethanol×Age	F 1,83=15.0, P<0.001
Treatment×Region×Age	F 12,332=2.3, P=0.008	Nicotine×Ethanol×Region×Age	F 4,332=4.3, P=0.002
Neuronal densities			
One-dimensional analyses		Two-dimensional analyses	
Treatment	F 3,50=7.8, P<0.001	Nicotine×Ethanol	F 1,50=7.2, P=0.01
Treatment×Region	F 12,200=3.4, P<0.001	Nicotine×Ethanol×Region	F 4,200=7.0, P<0.001
Treatment×Age	F 3,50=4.3, P<0.009	Nicotine×Ethanol×Age	F 1,50=4.3, P<0.04
Treatment×Region×Age	F 12,200=2.8, P=0.001	Nicotine×Ethanol×Region×Age	F 4,200=5.6, P<0.001
		Nicotine×Ethanol×Region×Age×Sex	F 12,200=1.7, P=0.06
		Nicotine×Ethanol×Age×Sex	F 1,50=3.2, P=0.08
Glial densities			
One-dimensional analyses		Two-dimensional analyses	
Treatment	F 3,50=9.3, P<0.001	Nicotine×Ethanol	F 1,50=11.7, P=0.001
Treatment×Region	F 12,200=2.8, P=0.002	Nicotine×Ethanol×Region	F 4,200=4.9, P<0.001
Treatment×Age	F 3,50=5.4, P=0.003	Nicotine×Ethanol×Age	F 1,50=3.1, P=0.08
Treatment×Region×Age	F 12,200=4.2, P<0.001	Nicotine×Ethanol×Region×Age	F 4,200=9.0, P<0.001
Treatment×Region×Age×Sex	F 12,200=1.7, P=0.07		

‘Region’ refers to the five hippocampal regions (GrDG, Mol, CA1, CA2, CA3). The interaction terms which showed no significant differences are not shown in the table.

Figure 1

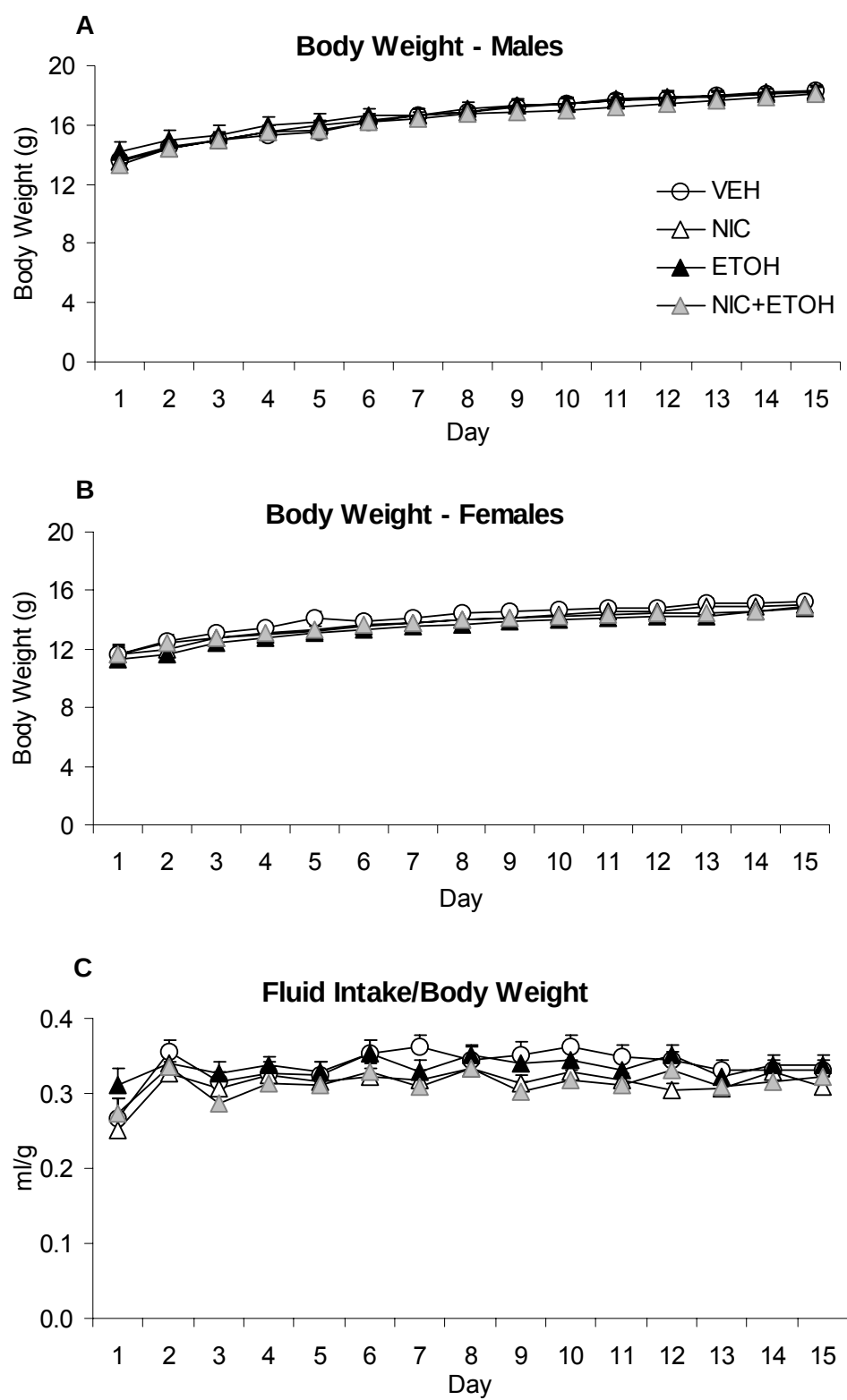


Figure 2

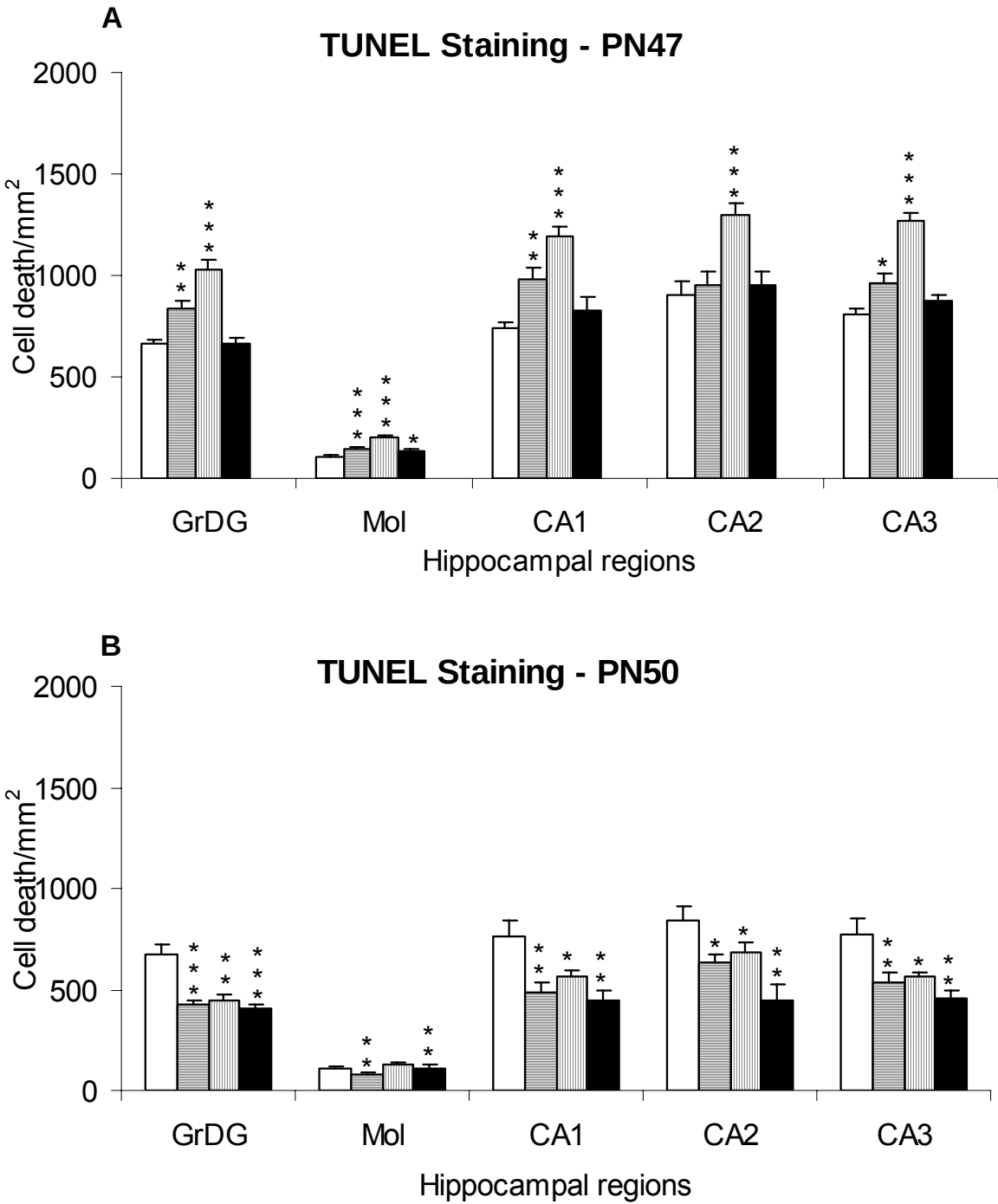


Figure 3

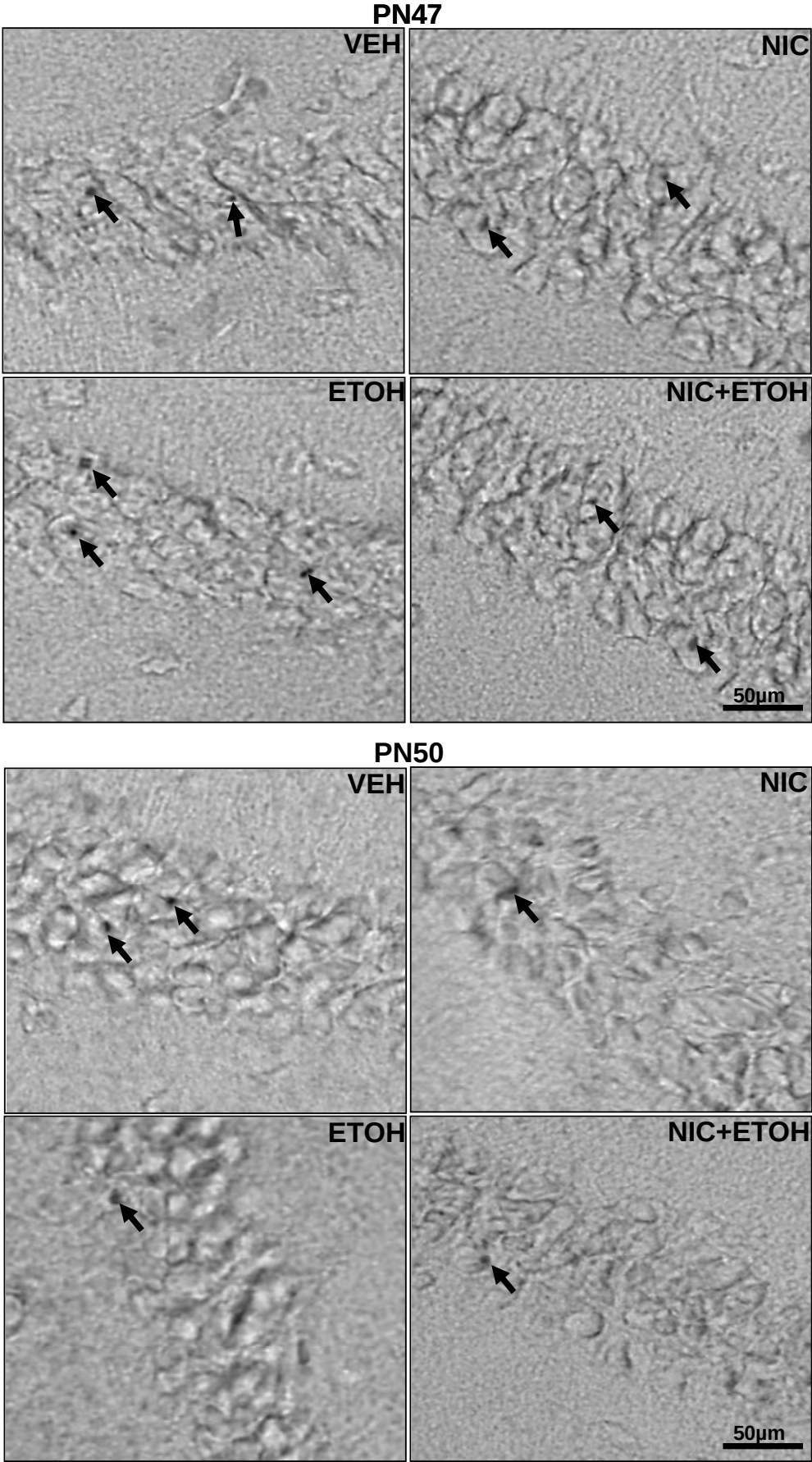


Figure 4

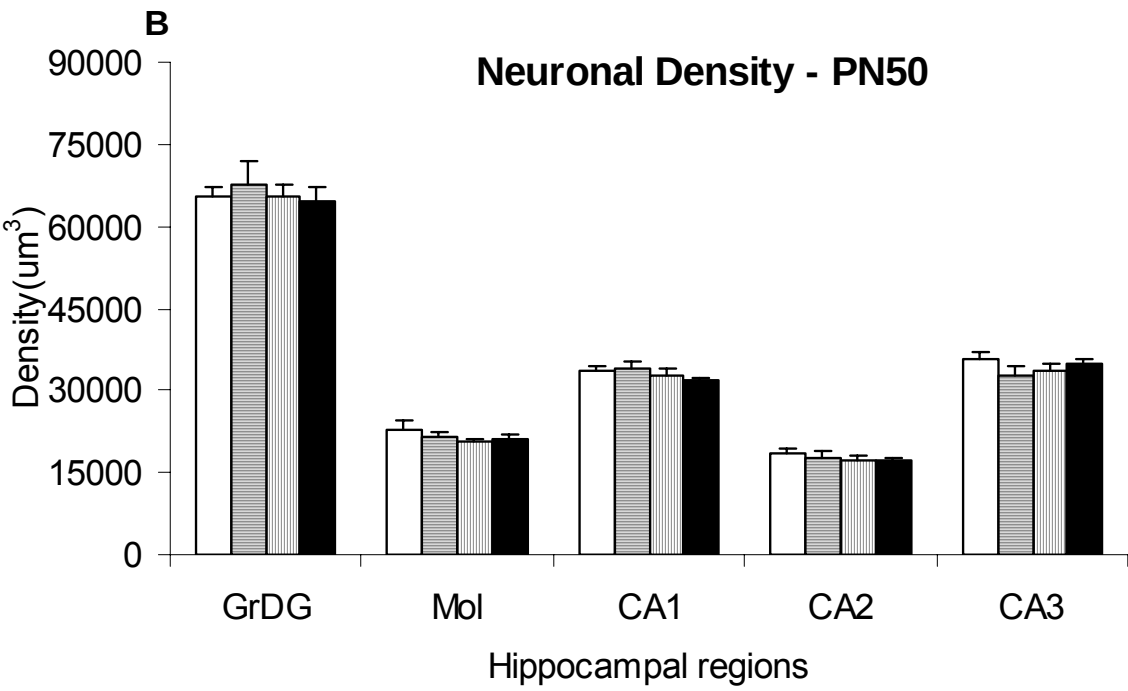
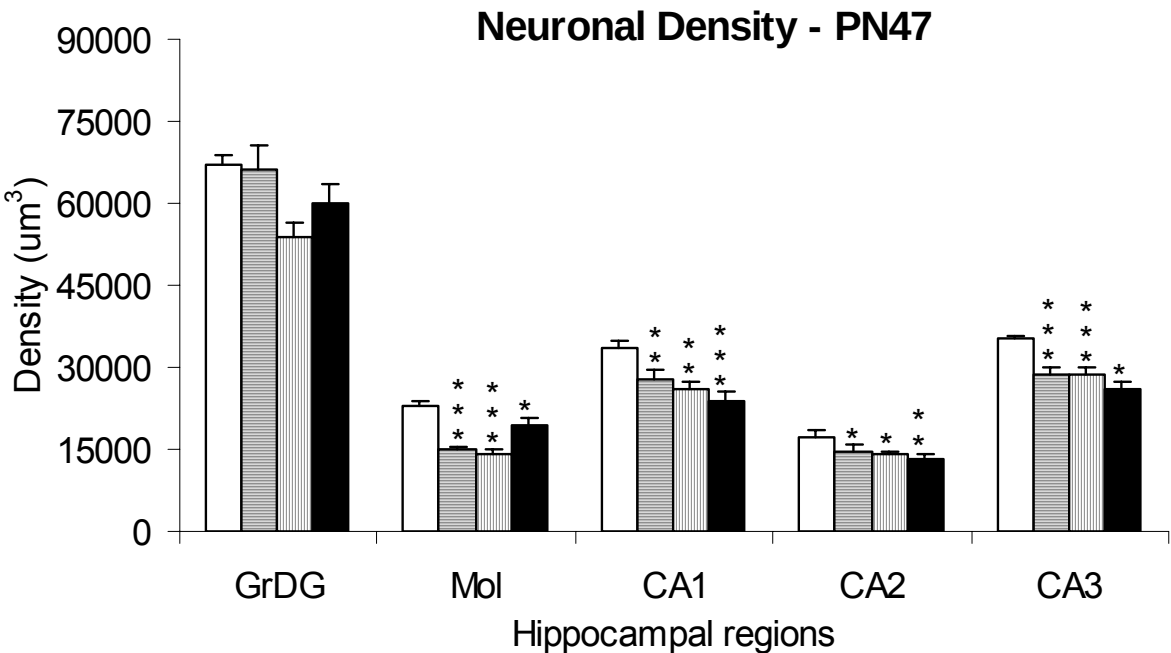


Figure 4

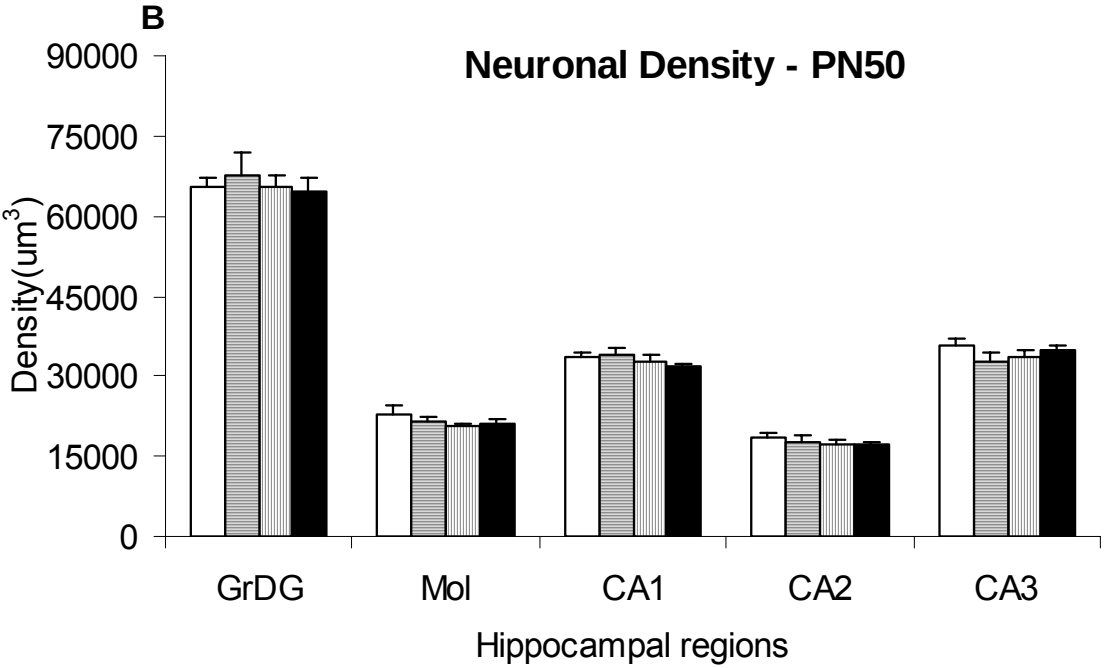
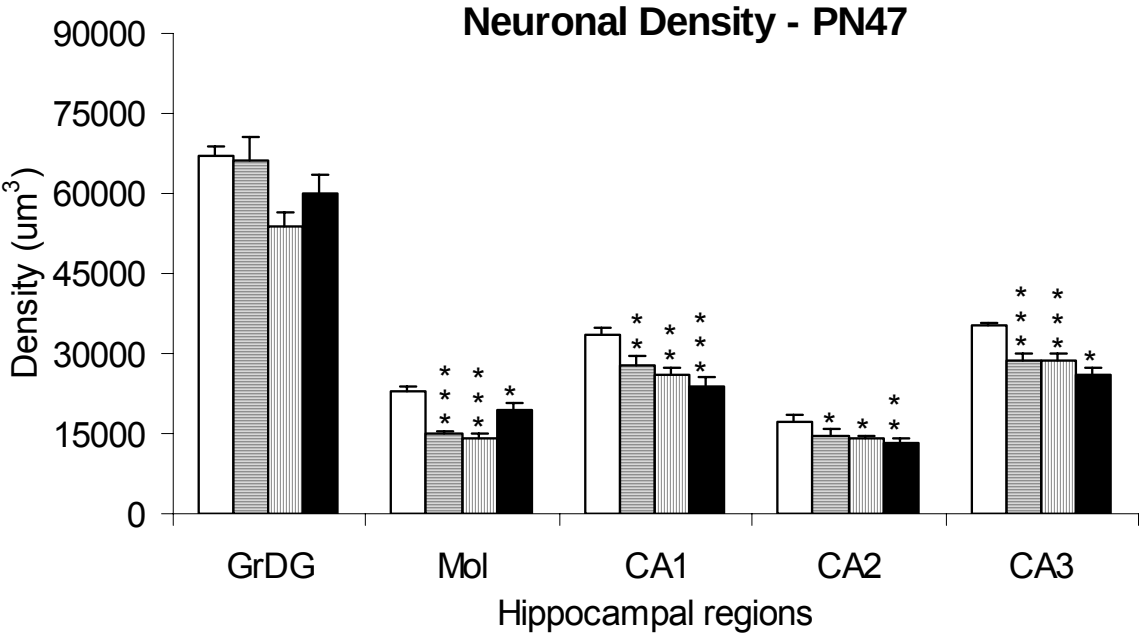
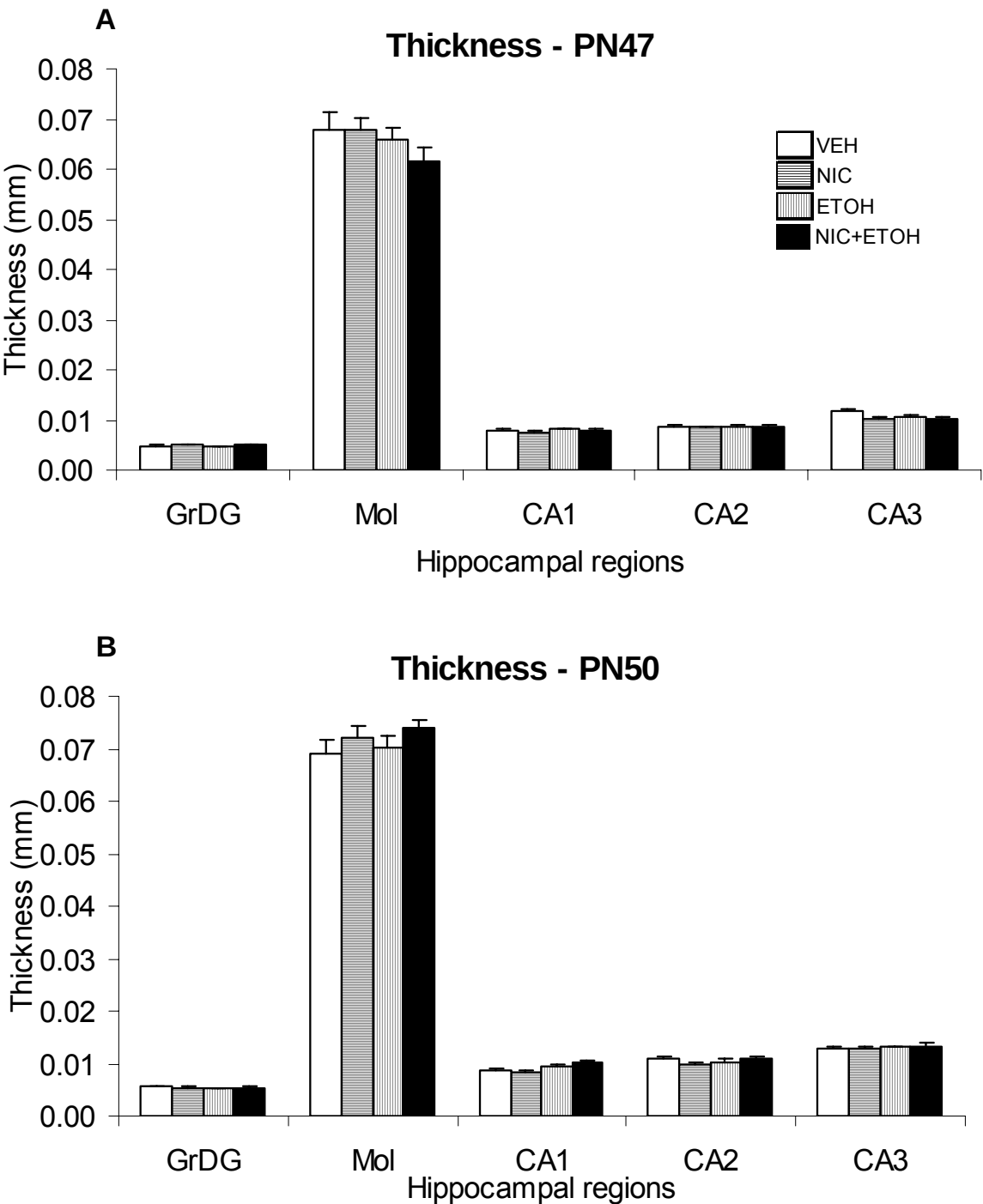


Figure 6



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](#)