



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

Anna Caroline de Carvalho Graça de Souza

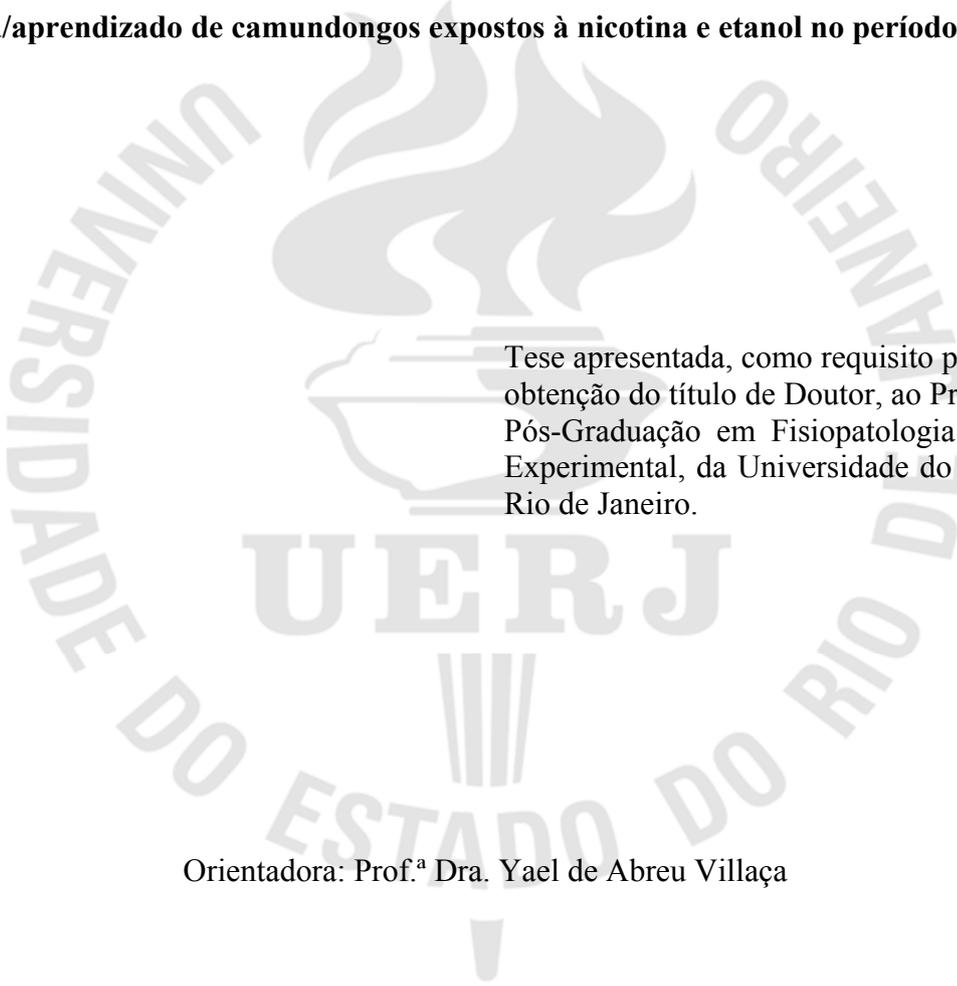
Vimocetina, um inibidor da fosfodiesterase, ameniza hiperatividade e déficits de memória/aprendizado de camundongos expostos à nicotina e etanol no período perinatal

Rio de Janeiro

2017

Anna Caroline de Carvalho Graça de Souza

Vimocetina, um inibidor da fosfodiesterase, ameniza hiperatividade e déficits de memória/aprendizado de camundongos expostos à nicotina e etanol no período perinatal



Tese apresentada, como requisito parcial 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 Dra. Yael de Abreu Villaça

Rio de Janeiro

2017

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

S731 Souza, Anna Caroline de Carvalho Graça de.

Vimocetina, um inibidor da fosfodiesterase, ameniza hiperatividade e déficits de memória/aprendizado de camundongos expostos à nicotina e etanol no período perinatal. / Anna Caroline de Carvalho Graça de Souza. – 2017.
132 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça

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

1. Gestantes– Teses. 2. Gestantes – uso de álcool - Teses. 3. Gestantes – uso de fumo – Teses. 4. Fumo – Efeito fisiológico – Teses. 5. Álcool – Efeito fisiológico - Teses. 6. Memória e aprendizado. 7. Assistência perinatal. 8. Disfunção cognitiva – Tratamento farmacológico. 9. Fármacos neuroprotetores. 10. Camundongo como animal de laboratório – Teses. I. Villaça, Yael de Abreu. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 618.2

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB-7/5302

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

Assinatura

Data

Anna Caroline de Carvalho Graça de Souza

Vimocetina, um inibidor da fosfodiesterase, ameniza hiperatividade e déficits de memória/aprendizado de camundongos expostos à nicotina e etanol no período perinatal

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

Aprovada em 24 de abril de 2017.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Thomas Eichenberg Krahe

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Penha Barradas

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dra. Adriana Melibeu

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dra. Tania Marcourakis

Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sérgio e Fátima por tudo! Pelo apoio, dedicação, incentivo e amor constantes. Sem vocês com certeza eu não teria completado essa jornada. Amo vocês!

Ao meu irmão Sérgio pelo companheirismo, amizade e confiança, principalmente pelo apoio. Amo-te!

Ao meu marido Marcus por todo amor, carinho, ajuda, dedicação e paciência. Amo-te incondicionalmente!

À minha orientadora Yael por todo apoio e confiança durante a realização desta tese, bem como, durante todo o meu percurso científico, 10 anos juntas. Aprendi muito com você!

Aos meus amigos do laboratório por fazerem dos meus dias no laboratório os mais agradáveis e engraçados possíveis. Em especial, àqueles que participaram da confecção deste trabalho. Gabi, Bruna e Vitor, obrigada por dividirem comigo essa tarefa!

Aos meus amigos da vida, obrigada por tudo!

“O sucesso é uma jornada e não um ponto final. Metade do prazer está em percorrer o caminho.”

(Gita Bellin)

RESUMO

DE SOUZA, Anna Caroline de Carvalho Graça. *Vimpocetina, um inibidor da fosfodiesterase, ameniza hiperatividade e déficits de memória/aprendizado de camundongos expostos à nicotina e etanol no período perinatal*. 2017. 132 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Estudos epidemiológicos indicam que há uma forte relação entre o fumo e o consumo de bebidas alcoólicas, de forma que o consumo combinado destas duas drogas é muito frequente. Isso sugere que o co-uso e o co-abuso de tabaco e etanol ocorrem com frequência também durante a gestação. A exposição a nicotina e etanol durante o desenvolvimento causa hiperatividade e prejuízos de memória/aprendizado e estudos recentes indicam que alterações na cascata de sinalização de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) podem contribuir para esses fenótipos. Apesar disso, existem poucos estudos que investigam os efeitos da exposição combinada a nicotina e ao etanol durante o desenvolvimento. Aqui, nos usamos como camundongos para investigar os efeitos da exposição a nicotina e/ou etanol durante o período pré natal, na atividade locomotora, na memória/aprendizado e nos níveis de AMPc, GMPc, CREB total e pCREB no hipocampo e no córtex cerebral. Adicionalmente, investigamos os efeitos do tratamento com vimpocetina (um inibidor da fosfodiesterase que é capaz de aumentar os níveis intracelulares de AMPc e GMPc) nestes comportamentos e marcadores bioquímicos. Camundongos suíços machos e fêmeas foram expostos a nicotina *free base* (50µg/ml) dissolvida em sacarina a 2% na água de beber ou somente sacarina a 2% durante a gestação até o 8º dia de vida pós natal (PN8). Etanol (5g/kg, i.p.) ou salina foram injetados nas ninhadas em dias alternados do 2º ao 8º dia de vida pós natal. Assim, nesse estudo, 4 grupos foram analisados: CONT, NIC, ETOH e NIC+ETOH. No 30º dia de vida pós natal, os animais receberam uma injeção de vimpocetina (20mg/Kg i.p.) ou veículo antes das avaliações da memória/aprendizado que foram realizadas através do teste da esQUIVA passiva e do teste do reconhecimento de objetos. Similarmente, vimpocetina (20mg/Kg i.p.) foi administrada nos animais antes da avaliação da atividade locomotora pelo teste do campo aberto. Após os testes comportamentais, os animais foram decapitados e as regiões cerebrais congeladas e armazenadas para posterior análise. No teste da esQUIVA passiva, observamos prejuízos na memória/aprendizado dos animais dos grupos, NIC, ETOH e NIC+ETOH e o tratamento com vimpocetina mitigou os déficits provocados pela exposição ao etanol e a nicotina+etanol. No teste do reconhecimento de objetos, identificamos prejuízos na memória de curto prazo nos grupos NIC e ETOH. Esses efeitos também foram mitigados pela administração da vimpocetina. Em relação a atividade locomotora, observamos hiperatividade somente no grupo que recebeu ambas as drogas juntas. Esse efeito, foi amenizado através do tratamento com a vimpocetina. Quanto aos níveis dos nucleotídeos cíclicos, constatamos reduções nos grupos expostos a NIC, ETOH e NIC+ETOH, sendo os efeitos mais consistentes no grupo NIC+ETOH, no qual a vimpocetina foi efetiva em restaurar os níveis dos nucleotídeos cíclicos. Houve aumento dos níveis de pCREB em resposta a administração de vimpocetina, com efeitos maiores no grupo NIC+ETOH. Os dados descritos suportam a idéia de que as cascatas de sinalização do AMPc e GMPc contribuem para a hiperatividade induzida pela nicotina+etanol como também para prejuízos na memória/aprendizado e fornecem evidências para o potencial uso terapêutico de vimpocetina em indivíduos co-expostos a essas drogas durante o desenvolvimento.

Palavras-chave: vimpocetina, gestação, etanol, nicotina, hiperatividade, memória/aprendizado.

ABSTRACT

DE SOUZA, Anna Caroline de Carvalho Graça. *Vinpocetine, a phosphodiesterase inhibitor mitigates hyperactivity and memory and learning deficits in mice exposed to nicotine and/or ethanol during the perinatal period.* 2017. 132 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Epidemiological studies indicate that there is a strong relationship between smoking and alcohol drinking, so that co-consumption is very frequent. This suggests that the co-use and co-abuse of tobacco and ethanol often occur during pregnancy as well. Developmental exposure to nicotine or ethanol evokes hyperactivity and memory/learning deficits and recent reports indicate that impairments in both cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling cascades contribute to these phenotypes. Despite that, there is a lack of studies that investigate the effects of nicotine combined to ethanol during development. Here, we used a mice model to investigate the effects of exposure to nicotine and/or ethanol in the perinatal period on locomotor activity and memory/learning, AMPc, GMPc, total CREB and pCREB levels in the hippocampus and cerebral cortex. Additionally, we investigated the effects of the treatment with vinpocetine, (a phosphodiesterase inhibitor that increases intracellular cAMP and cGMP levels) on these behaviors and biochemical measures. Swiss male and female mice were exposed to nicotine free base (50µg/ml) dissolved in saccharin 2% or to saccharin 2% to drink during gestation and until the 8th day of postnatal life (PN8). Ethanol (5g/kg, i.p.) or saline were injected in the pups in alternate days from the 2nd to the 8th day of postnatal life. Accordingly, four groups were analyzed: VEH, NIC, ETOH and NIC+ETOH. At the 30th postnatal day the animals either received vinpocetine (20mg/Kg i.p.) or vehicle before memory/learning was evaluated in the step-down passive avoidance test and object recognition test and locomotor activity was evaluated in the open field. After the behavioral tests, the animals were decapitated and the brain regions fast-frozen and stored until analysis. In the step-down passive avoidance test, there were memory/learning deficits in NIC, ETOH and NIC+ETOH mice and the treatment with vinpocetine mitigated the ETOH and NIC+ETOH-induced deficits. In the object recognition test, short-term memory deficits were identified in the NIC and ETOH groups. These effects were also mitigated by vinpocetine administration. Locomotor hyperactivity was identified only in the NIC+ETOH group. This effect was ameliorated with treatment with vinpocetine. While cyclic nucleotides levels were reduced by NIC, ETOH and NIC+ETOH exposures, this effect was more consistent in the NIC+ETOH group, in which vinpocetine effectively restored cyclic nucleotides levels. pCREB levels were increased in response to vinpocetine administration, with stronger effects in the NIC+ETOH group. These data lend support to the idea that cAMP and cGMP signaling cascades contribute to NIC+ETOH-induced hyperactivity and memory/learning deficits and provide evidence for the potential therapeutic use of vinpocetine in individuals co-exposed to these drugs during development.

Keywords: vinpocetine, pregnancy, ethanol, nicotine, hyperactivity, memory/learning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Alterações faciais observadas na FASD	26
Figura 2-	A inibição da fosfodiesterase de tipo 1 (PDE1) leva ao aumento de cAMP e cGMP e, finalmente, à expressão de genes relacionados com a plasticidade	37
Figura 3-	A inibição da fosfodiesterase de tipo 1 pode levar à fosforilação dos receptores AMPA e sua incorporação à sinapse	39
Figura 4-	Linha Temporal	44
Figura 5-	Teste Esquiva Passiva	47
Figura 6-	Teste do Campo Aberto	48
Figura 7-	Teste do Reconhecimento de Objetos	50
Figura 8-	Dados não publicados - Dr. Alexandre Medina, University of Maryland, USA.....	52
Figura 9-	Ensaio Imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak para quantificação de AMPc.....	54
Figura 10-	Equipamento “Precellys (BERTIN TECHNOLOGIES, França).....	55
Figura 11	Equipamento Leitor de Elisa (Biochrom Asys modelo UVM340, Estados Unidos)	56
Figura 12	Ensaio Imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak de GMPc	57
Figura 13	Evolução do consumo de líquido das mães que receberam água+sacarina ou nicotina+sacarina como fonte de líquido durante a gestação e durante o período de lactação	62
Figura 14	Evolução da massa corporal dos neonatos que receberam injeção intraperitoneal de etanol na dose de 5g/kg, em dias alternados, durante a primeira semana de vida pós-natal (PN2, PN4, PN6 e PN8) ou que receberam salina, também através de injeções intraperitoneais	63
Figura 15	Massa corporal de fêmeas expostas a nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento pré e pós-natal recente e submetidas ao teste da Esquiva Passiva e Campo Aberto, no 30º dia de via pós natal quando foram separados por tratamento: vimpocetina na dose de 20mg/kg ou DMSO administrados através de uma única injeção intraperitoneal	65

Figura 16	Massa corporal de machos expostos a nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento pré e pós-natal recente e submetidos ao teste da Esquiva Passiva e Campo Aberto, no 30º dia de via pós natal quando foram separados por tratamento: vimpocetina na dose de 20mg/kg ou DMSO administrados através de uma única injeção intraperitoneal	66
Figura 17	Massa corporal de fêmeas expostas a nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento pré e pós-natal recente e submetidas ao teste do Reconhecimento de Objetos, no 31º dia de via pós natal quando foram separados por tratamento: vimpocetina na dose de 20mg/kg ou DMSO administrados através de uma única injeção intraperitoneal	67
Figura 18	Massa corporal de machos expostos a nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento pré e pós-natal recente e submetidos ao teste do Reconhecimento de Objetos, no 31º dia de via pós natal quando foram separados por tratamento: vimpocetina na dose de 20mg/kg ou DMSO administrados através de uma única injeção intraperitoneal	68
Figura 19	Média da ambulacão total em 10 minutos no teste do campo aberto dos animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que, 4 horas antes do teste, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	69
Figura 20	Média do tempo total no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto dos animais que foram expostos nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que, imediatamente antes do teste, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg DMSO	70
Figura 21	Latência para descer da plataforma, em até 180 segundos, no teste da esquiva passiva, na sessão T6 dos animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que uma hora antes da primeira sessão (T0), receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	72

Figura 22	Latência para descer da plataforma, em até 180 segundos, no teste da esQUIVA passiva, na sessão T24 dos animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol intraperitoneal durante o desenvolvimento e que uma hora antes da primeira sessão (T0), receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	73
Figura 23	Interação entre os objetos A1 e A2 durante a sessão de treino de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	74
Figura 24	Interação entre os objetos A1 e B durante a sessão 1 de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que, duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	75
Figura 25	Interação entre os objetos A1 e C durante a sessão 2 de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol intraperitoneal durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	76
Figura 26	Índice obj 2/(obj 1+2) *100 durante a primeira sessão de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	77
Figura 27	Índice obj 2/(obj 1+2) *100 durante a segunda sessão de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol intraperitoneal durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	78
Figura 28	Índice obj 2/(obj 1+2) *100 pra fêmeas durante a segunda sessão de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	79
Figura 29	Índice obj 2/(obj 1+2) *100 pra machos durante a segunda sessão de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou DMSO	80

Figura 30	Quantificação de AMPc realizado por um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, no hipocampo de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto	81
Figura 31	Quantificação de AMPc realizado por um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, no córtex de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto	81
Figura 32	Quantificação de GMPc realizado por um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, no hipocampo de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto	83
Figura 33	Quantificação de GMPc realizado por um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, no córtex de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto	84
Figura 34	Expressão de CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca ⁺⁺) por Western Blotting no córtex esquerdo de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto...	85
Figura 35	Expressão de pCREB (proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca ⁺⁺ fosforilada) por Western Blotting no córtex esquerdo de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Efeitos na saúde associados ao tabagismo durante a gestação.....	18
Tabela 2-	Características da FASD relacionadas a idade.....	27
Tabela 3-	Tipos de fosfodiesterases presentes no sistema nervoso.....	35
Tabela 4-	Localização das diferentes fosfodiesterases (PDEs) no cérebro de roedores e humanos na idade adulta	36
Tabela 5-	Anticorpo específicos.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AC	Adenil Ciclase
AMP	Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise de Variância
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> (Fator neurotrófico derivado do encéfalo)
cm	Centímetros
Ca ⁺²	Cálcio.
CaM	Calmodulina.
CONT	Controle (Sacarina+Salina)
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca ⁺⁺
DDAH	Déficit de Atenção e Hiperatividade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ERK	Quinases Reguladoras de sinais Extracelulares
ETOH	Etanol
FASD	<i>Fetal Alcohol Spectrum Disorder</i> (Desordem espectral alcoólica fetal)
FGF	Fibroblast Growth Factor
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
GC	Guanilato Ciclase
GMP	Guanosina Monofosfato
HIV/AIDS	<i>Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilograma
LDT	Núcleo Tegumentar Laterodorsal
Ma	Miliampére
MEK	Proteína quinase quinase ativada mitoticamente.
Mg	Miligrama
Min	Minutos
nAChRs	Receptores Nicotínicos Colinérgicos
NIC	Nicotina

NIC+ETOH	Nicotina + etanol
NMDA	N-metil-D-aspartato
P	Valor de prova
PDE1	Fosfodiesterase do Tipo 1
PDEs	Fosfodiesterases
PGC-1 α	<i>Receptor gama coativador 1 alfa</i>
PN	Dia de vida pós-natal
PN30	30º dia pós-natal
PRAMS	<i>Pregnancy Risk Assessment Monitoring System</i> (Sistema de Monitoramento da Avaliação do Risco da Gravidez)
PKA	Proteína Quinase A
PKG	Proteína Quinase G
QI	Coefficiente de Inteligência
RAS	Sistema de Ativação Reticular
S	Segundos
SAC	Sacarina
SAL	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
SMSI	Síndrome da morte súbita infantil
SRF	Serum Response Factor
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
VP20	Vimocetina a 20mg/Kg

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1.	OBJETIVOS	41
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1.	Animais	42
2.2.	Exposição às drogas	42
2.3.	Formação dos grupo experimentais	44
2.4.	Testes comportamentais	45
2.4.1.	<u>Esquiva Passiva</u>	46
2.4.2.	<u>Campo Aberto</u>	47
2.4.3.	<u>Reconhecimento de Objetos</u>	48
2.5.	Administração da Vimpocetina	51
2.6.	Sacrifício e dissecação das regiões encefálicas	52
2.7.	Quantificação do AMPc	53
2.7.1.	<u>Preparação do tecido</u>	54
2.7.2.	<u>Preparação da placa</u>	55
2.8.	Quantificação do GMPc	56
2.8.1.	<u>Preparação do tecido</u>	57
2.8.2.	<u>Preparação da placa</u>	58
2.9.	Análise da expressão de proteínas-CREB e Pcreb – por Western Blotting ... 58	
2.10.	Análise estatística	60
2.10.1.	<u>Análise da massa corporal e ingestão de líquido</u>	60
2.10.2.	<u>Análise dos testes comportamentais</u>	61
2.10.3.	<u>Análise da avaliação neuroquímica</u>	61
3.	RESULTADOS	62
3.1.	Ingesta Líquida das mães durante a lactação	62
3.2.	Massa corporal dos neonatos	63
3.3.	Massa corporal dos animais adolescentes	64
3.4.	Testes comportamentais	68
3.4.1.	<u>Campo Aberto</u>	68
3.4.1.1.	Ambulação total.....	68

3.4.1.2.	Comportamento associado à ansiedade.....	70
3.4.2	<u>Esquiva Passiva</u>	71
3.4.3	<u>Reconhecimento de Objetos</u>	73
3.4.3.1.	Atividade exploratória total direcionada aos objetos (obj 1 + obj 2).....	73
3.4.3.2.	Memória/aprendizado (índice: obj 2/(obj 1+2) *100).....	76
3.5.	Quantificação de AMPc	80
3.5.1.	<u>No hipocampo</u>	80
3.5.2.	<u>No córtex</u>	81
3.6.	Quantificação de GMPc	82
3.6.1	<u>No hipocampo</u>	82
3.6.2	<u>No córtex</u>	83
3.7.	Quantificação CREB e pCREB	84
3.7.1.	<u>CREB</u>	84
3.7.2.	<u>pCREB</u>	86
4	DISCUSSÃO	88
4.1	Resumo dos resultados	88
4.2.	Vias de administração	91
4.3.	Massa corporal	93
4.4.	Efeitos da exposição precoce a nicotina e/ou etanol e tratamento com vimpocetina/DMSO na atividade locomotora no Teste do Campo Aberto	94
4.5.	Efeitos da exposição precoce a nicotina e/ou etanol no comportamento associado a ansiedade do Teste do Campo Aberto	95
4.6.	Efeitos da exposição a nicotina e/ou etanol e tratamento com vimpocetina/DMSO nas sessões T6 e T24, no Teste da Esquiva Passiva	96
4.7.	Efeitos da exposição a nicotina e/ou etanol e do tratamento com vimpocetina/DMSO no Teste de Reconhecimento de Objetos	98
4.8.	Efeitos da exposição a nicotina e etanol conjuntamente e do tratamento com vimpocetina/DMSO na quantificação do AMPc no córtex	100
4.9.	Efeitos da exposição a nicotina e nicotina/etanol e do tratamento com vimpocetina/DMSO na quantificação do GMPc no hipocampo e no córtex	101

4.10.	Efeitos do tratamento com vimpocetina/DMSO na quantificação do CREB e do Pcreb no córtex.....	102
4.11.	Associações entre as alterações neuroquímicas (AMPc, GMPc, CREB e pCREB e os achados comportamentais.....	103
	CONCLUSÕES.....	106
	REFERÊNCIAS.....	107

INTRODUÇÃO

Gestação, drogas e o sistema nervoso

O sistema nervoso em desenvolvimento é mais vulnerável a danos que o sistema nervoso do adulto. De fato, o período de formação do cérebro é mais longo que o de outros órgãos. Seu desenvolvimento tem início no período pré-natal e continua de forma intensa durante o período pós-natal, sendo que, ao longo deste tempo, ocorrem eventos como proliferação de neurônios, apoptose, formação e rearranjo sináptico em diversas regiões (Altman e Bayer 1990, Bayer 1983, Bayer et al. 1982, Huttenlocher 1990, McWilliams e Lynch 1983, Spear 2000).

Dentre os diversos fatores que podem afetar o desenvolvimento do sistema nervoso, as ações de diversas substâncias, em especial drogas de abuso, tem sido foco de atenção uma vez que o uso e abuso pela gestante são considerados fator de risco para o feto, aumentando a probabilidade de ocorrência de uma série de distúrbios que podem perdurar durante toda a vida do indivíduo, dentre eles déficits de memória e aprendizado, ganho de peso reduzido, prematuridade, etc. Drogas de abuso legalizadas como bebidas alcoólicas e o tabaco ganham destaque uma vez que, em parte devido ao fácil acesso e por estarem inseridas em diversas culturas, estão entre as drogas mais consumidas no mundo como claramente demonstrado por estudos epidemiológicos (Larsson e Engel, 2004).

Tem-se demonstrado que a exposição ao cigarro tem efeitos adversos sobre o desenvolvimento do feto. O tabagismo materno pode levar a déficits que ficam evidentes no início da vida pós-natal, que incluem: asma (Gilliland et al., 2001), infecções respiratórias (Young et al., 2000), síndrome de abstinência da nicotina, peso reduzido ao nascer e síndrome da morte súbita na infância (Jaddoe et al., 2008; Mitchell et al., 1993), déficits de atenção que podem estar relacionados com defeitos no processamento auditivo, dificuldade com leitura, matemática e habilidades relacionadas (Batstra et al., 2003). Além disso, o tabagismo materno continua a ser um fator de risco durante a infância e a adolescência para problemas cognitivos e neurocomportamentais, como o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), transtorno de conduta, desordens de hiperatividade e abuso de substâncias (Thapar et al., 2003; Button et al., 2007, U.S. Department of Health and Human Services, 2014). De forma resumida, fumar na gravidez é a causa evitável mais importante de uma ampla gama de resultados adversos da gravidez. Fumar causa complicações obstétricas e fetais havendo evidências crescentes de dano grave que se estende da infância até a idade adulta (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos na saúde associados ao tabagismo durante a gestação

	EFEITOS NA SAÚDE	COMENTÁRIOS
Fertilidade	Atraso na Concepção	2 meses em média
	Infertilidade - Mulher	60% de aumento do risco de infertilidade (SC=1.6)
	Infertilidade - Homem	Diminuição do volume de sêmen, do número de sptz e aumento de formais anormais
	Reprodução Assistida	Redução de 44% de chance de um nasc. vivo por ciclo (RC=0.54)
Obstétrico	Aborto Espontâneo	RC = 1.8
	Nasc. prematuro (<37sem.)	Dois vezes maior
	Placenta prévia	RC = 2.1
	Descolamento de placenta	RC = 1.6
	Natimorto	RC = 1.1 - 3.2
	Gravidez Ectópica	RC = 2.5
	Rupturas prematuras de membranas	RC = 2.1
	Pré-eclampsia	RC = 0.51
Fetal	Restrição no crescimento	200g mais leve em média
	Baixo peso ao nascer (2500g)	RC = 3.0
	Pequeno para a idade gestacional	RC = 3.8>35 anos (<35 anos = ns)
	Defeitos de nascença	Defeitos de redução do membro, pé torto, fendas orais, defeitos oculares e efeitos gastrointestinais (SR= 1.25-1.5). Também muitos outros efeitos menores.
Crianças e adultos	SMSI	RC = 2.25
	Diabetes Tipo 2	RC = 1.1
	Obesidade	RC = 1,52
	Hipertensão	Aumento de 1.5-5.4 mm Hg
	HDL	Diminuição de 0.14 mmol/L
	Dependência a nicotina	Dobro de risco
	Respiratório	Asma, infecção respiratória baixa, diminuição da função pulmonar
	Cognição	Performance acadêmica e habilidade cognitiva prejudicada
	Comportamento	Transtorno de conduta, DDAH, comportamento anti-social
	Desordens Psiquiátricas	Significativo aumento da maioria das desordens psiquiátricas no adulto jovem

RC = Razão de Chances; ns = não significativo

Legenda: SMSI: Síndrome da Morte Súbita Infantil. HDL: *High Density Lipoproteins*/ Lipoproteínas de Alta Densidade. DDAH: Déficit de Atenção e Hiperatividade.

Fonte: Modificado de MENDELSON et al, 2014.

Em países desenvolvidos, a prevalência de fumo varia de 11 a 35% em mulheres grávidas (MMWR 2004, Schneider e Schütz, 2008), sendo que estes percentuais podem ser ainda maiores devido ao fato de que grávidas frequentemente não admitem que estão fumando (England et al., 2007). Estudo realizado durante os anos de 2000-2010 em 40 locais incluídos no PRAMS (*Pregnancy Risk Assessment Monitoring System*), Sistema de Monitoramento da Avaliação do Risco da Gravidez, nos Estados Unidos, forneceu dados sobre tendências do tabagismo antes, durante e após a gravidez. Para a maioria dos locais, a prevalência de tabagismo antes, durante ou após a gravidez não se alterou ao longo do tempo. Durante os anos de 2000-2010, um aumento na prevalência do tabagismo antes da gravidez (somente) ocorreu em Oklahoma, e um aumento durante e após a gravidez ocorreu em Maine. Para um subgrupo de 10 locais para os quais os dados estavam disponíveis para todo o período de 11 anos do estudo (Alaska, Arkansas, Colorado, Havaí, Maine, Nebraska, Oklahoma, Utah, Washington e West Virginia), a prevalência de fumar antes da gravidez permaneceu inalterada, com aproximadamente uma em cada cinco mulheres relatando fumar antes da gravidez (23,6% em 2000 para 24,7% em 2010). A prevalência de tabagismo durante a gravidez diminuiu de 13,3% em 2000 para 12,3% em 2010 e a prevalência de tabagismo pós-parto diminuiu de 18,6% em 2000 para 17,2 % em 2010. Infelizmente, a maioria dos fumantes que engravidam continuam a fumar e a maioria que abandonam antes do parto, tem recaída após o parto (Mendelsohn et al, 2014).

Estes dados sugerem uma tendência de declínio na proporção de mulheres tabagistas em países desenvolvidos, porém, não é o que se observa em países em desenvolvimento. No Brasil, em média, 1.600 mulheres morrem anualmente devido a gravidez, parto e pós-parto e 50.000 crianças morrem com menos de um ano de idade. Entre as causas estão as complicações associadas ao uso de substâncias durante a gravidez, incluindo o tabaco (Zhang et al, 2011). Estudos do Sul do Brasil revelaram prevalência de tabagismo entre mulheres grávidas de 23% a 27,5%, taxas elevadas quando comparadas à população feminina adulta, 15,9%. As fumantes grávidas também têm níveis educacionais mais baixos e vão menos a consultas pré-natais do que as não-fumantes. Entre as fumantes estudadas, apenas 1,19% receberam algum tipo de tratamento de atenção/medicação para a cessação do tabagismo (Barros et al, 2006; Galão et al, 2009).

Em relação ao álcool, essa é uma substância com propriedades psicotrópicas presente nos diversos tipos de bebidas alcoólicas e um potente agente teratogênico com a capacidade de atravessar a placenta livremente fazendo com que a mãe e o feto tenham concentração

semelhante da substância no sangue (Hannigan e Armant, 2000; Welch-Carre, 2005). Estas características tornam o consumo de álcool por gestantes um grave problema de saúde pública.

Uma das consequências mais severas do consumo de etanol durante a gravidez é a Desordem espectral alcoólica fetal (*Fetal Alcohol Spectrum Disorder* – FASD) (Guerra et al., 2009; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007). Estima-se que a prevalência da FASD seja de 9,1 casos por 1000 nascimentos (Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007; May et al., 2009), taxa esta que é duas vezes maior que a das duas alterações congênitas mais comuns (síndrome de Down e espinha bífida) combinadas (May e Gossage, 2001; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007). Quando as análises se restringem a crianças e adolescentes em idade escolar, estes números são ainda maiores, variando entre 2 a 5% em países em desenvolvimento (May et al., 2009; May et al., 2011; Riley et al., 2011). Dentre as várias alterações associadas a FASD está o retardo mental. Outros distúrbios comuns incluem o TDAH (Burd et al., 2003) e os déficits de aprendizado e memória (Acheson et al., 2001; Harris et al., 1995).

Os efeitos da exposição ao etanol durante o desenvolvimento variam em função do período de exposição, sendo o terceiro trimestre da gestação de humanos um período de grande susceptibilidade (Dobbing e Sands 1979; Nunes et al., 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde cerca de 47% das mulheres com idade acima de 15 anos faz uso de bebidas alcoólicas (The World Health, 2014). Dentre estas, estima-se que 13 a 20% delas fazem uso de bebidas alcoólicas durante a gravidez (Balachova et al., 2012, Centers for Disease and Prevention, 2009, Senecky , 2011).

Estudos epidemiológicos apontam para uma forte relação entre o fumo e o consumo de etanol, de forma que a co-ocorrência de alcoolismo e tabagismo é muito frequente (Larsson e Engel, 2004, Bien e Burge 1990, Dani e Harris, 2005, Istvan e Matarazzo, 1984, Miller e Gold, 1998, SAMHSA 1999, Sobell et al., 1990), e esse abuso simultâneo de drogas é prevalente entre mulheres jovens em idade fértil (Dierker et al., 2006, Nordberg et al., 1991, SAMHSA 1999, Weitzman e Chen, 2005), o que sugere que o co- uso e co-abuso de tabaco e etanol ocorram com frequência também durante a gravidez. Apesar disso, há poucos estudos que focam na investigação dos efeitos do co-consumo de tabaco e etanol. Na verdade, os estudos epidemiológicos se esforçam em isolar o efeito de uma das drogas. Essa abordagem, embora seja importante para a correta identificação dos desfechos do consumo de uma dada droga durante a gestação, falha ao ignorar que há interação entre drogas, de forma que os efeitos de uma droga potencialmente interferem na ação de outra.

Cabe mencionar ainda que grandes avanços no entendimento dos mecanismos de ação

de drogas de abuso tem sido obtidos com o uso de modelos animais de exposição. De fato, o desenvolvimento do sistema nervoso de roedores em vários aspectos se assemelha ao desenvolvimento de humanos, contudo, ao nascer, o sistema nervoso de roedores é consideravelmente menos maduro que o sistema nervoso humano, assim, os primeiros 10 dias de vida pós-natal do roedor podem ser comparados ao terceiro trimestre da gestação humana (Bayer et al., 1993; Quinn, 2005; Dwyer et al., 2008). Desta forma, em roedores, o período que corresponde à gestação de humanos se estende do início da gestação até aproximadamente o 10º dia de vida pós-natal, fato que deve ser levado em consideração no desenho e análise de resultados obtidos com o uso de roedores.

Tabaco

O fumo é um sério problema de saúde pública (Centers for Disease Control and Prevention, 2002; Zvolensky et al., 2005). O consumo de tabaco é universalmente reconhecido como estando associado a diversas desordens entre elas câncer, danos cardiovasculares, pulmonares e alterações gastrointestinais (Chen et al., 2002; Gritz et al., 2005; Jindal et al., 2004; Leone, 2005; Thomas et al., 2005). Sabe-se que o tabagismo está relacionado a, no mínimo, 30% de todas as mortes por câncer. É fator de risco para o aparecimento dos carcinomas de pulmão, boca, faringe, laringe, esôfago, estômago, pâncreas, cérvix uterina, rim e bexiga. A morbidade por doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença péptica e outras afecções também é mais elevada entre tabagistas (Balbani et al., 2005). Adicionalmente, há consenso que o tabaco é prejudicial à saúde de fetos e crianças, como dito acima (Witschi et al., 1997, Cornelius e Day, 2000). Dados epidemiológicos revelam que tem sido encontrada alta taxa de fumantes entre indivíduos com desordens psiquiátricas, incluindo aqueles com desordens de ansiedade (Lasser et al., 2000). Algumas evidências dão suporte à idéia de que a ansiedade é um sintoma que aumenta a probabilidade de se iniciar o hábito de fumar (Morissete et al., 2007).

Atualmente, o uso do tabaco é a principal causa mundial de morte evitável. Essa prática mata cerca de 6 milhões de pessoas e causa prejuízos econômicos de centenas de bilhões de dólares em todo o mundo, a cada ano. Ao longo do século 21, o uso de tabaco pode matar um bilhão de pessoas ou mais. Isto porque, apesar da adoção de rigorosas campanhas antifumo em muitos países, atualmente as pessoas fumam mais do que durante qualquer outra época da história humana. (WHO, 2011a; Dinas et al., 2011).

A folha do tabaco contém complexa mistura de componentes químicos, como: ácidos graxos, isoprenos, ésteres e minerais inorgânicos. Desta forma, a fumaça resultante da queima do tabaco é bastante complexa e dinâmica, sendo uma mistura heterogênea de gases, vapores e partículas líquidas. Apresenta aproximadamente 4800 constituintes identificados entretanto estima-se que o número de componentes não identificadas seja dez vezes maior que o número dos constituintes identificados (Adam et al., 2006; Araújo et al., 2004).

Nicotina

No tabaco, destaca-se a presença da nicotina. Considerada um de seus principais componentes ativos, a nicotina tornou-se uma droga universal. Anualmente no mundo, é consumida a fabulosa quantidade de 73 mil toneladas de nicotina contida em 7 trilhões e 300 bilhões de cigarros fumados por cerca de 1 bilhão e 300 milhões de tabagistas, dos quais 80% vivem nos países em desenvolvimento (OPS-BM, 2000; WHO, 2004).

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

A nicotina tem sido descrita como sendo um dos componentes ativos da fumaça do cigarro responsável por uma grande variedade de efeitos no sistema nervoso que resultam do consumo de tabaco (Benowitz, 1992; Dani e Heinemann, 1996). Estudos indicam que ações da nicotina são responsáveis pelas bases farmacológicas do vício ao cigarro. (US Department of Health and Human Services, 1988; Royal College of Physicians, 2000). A nicotina induz tolerância e dependência pela ação nas vias dopaminérgicas centrais, levando às sensações de prazer e recompensa mediadas pelo sistema límbico. É um estimulante do sistema nervoso central (SNC), aumenta o estado de alerta e reduz o apetite. A diminuição de 50% no consumo da nicotina pode desencadear sintomas de abstinência nos indivíduos dependentes: ansiedade, irritabilidade, distúrbios do sono, aumento do apetite, alterações cognitivas e fissura pelo cigarro (Balbani e Montovani, 2005).

Estudos em modelos animais de exposição à nicotina também têm mostrado que esta induz seus efeitos farmacológicos centrais atuando em receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs), os quais estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central, principalmente na membrana pré-sináptica e atuam como receptores ionotrópicos que promovem liberação de neurotransmissores (Wonnacott, 1997). Assim, a ativação de nAChRs tem papel neuromodulador no SNC e está envolvido em um grande número de processos fisiológicos e patológicos como a neurotransmissão da dor, controle de movimentos, processos cognitivos, respostas emocionais, e efeitos de drogas de abuso (Buisson e Bertrand, 2002; File et al., 2002; Jain, 2004; Katner et al., 2004; Schochet et al., 2004). Ao lado disso, modelos animais de exposição pré natal sugeriram alterações duradouras no conteúdo de neurotransmissores, por exemplo, acetilcolina, catecolaminas, orexina e fatores tróficos, no desenvolvimento de ninhadas que sofreram exposição pré natal a nicotina (Navarro et al, 1988; Tizabi et al, 1997; Franke et al 2008; Wei et al, 2011; Harrod et al, 2011; Zhu et al, 2012; Morgan et al, 2013). Estudo recente demonstrou que a exposição pré natal a nicotina altera os níveis na proteína BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) em três regiões cerebrais: núcleo acumbente, estriado dorsal e córtex pré-frontal, reforçando a hipótese de que o tabagismo materno durante a gestação produz alterações na plasticidade neuronal. Os achados atuais demonstram que essas mudanças são persistentes até a idade adulta (Lacy et al, 2016).

É bem estabelecido na literatura que a nicotina é neuroteratogênica, afetando o cérebro pela interferência com mecanismos de mitose e diferenciação, causando alterações na axonogênese e sinaptogênese e conseqüentemente comprometendo a atividade sináptica e comportamento (Slikker et al., 2005; Slotkin, 2002). Em relação ao hábito de fumar durante a gestação, sabe-se que a nicotina passa a barreira placentária e hemato-encefálica do feto. A nicotina também é eliminada pelo leite materno, de forma que o recém-nato cuja mãe é fumante continua a ser exposto a nicotina não somente pelo ambiente, mas também pelo leite. Quando a mãe fuma em torno de 7 cigarros em duas horas, os níveis de nicotina no leite chegam até 0,6 mg por litro (Ferguson et al., 1976; Hatcher e Grusby, 1927). Estudo recente demonstrou que a exposição pós-natal precoce de filhotes de ratos à nicotina via leite materno, prejudica a memória dependente do hipocampo a longo prazo, mas não a curto prazo, durante a adolescência (Nakauchi et al, 2015).

Mizrak e colaboradores, observaram que a exposição de longo prazo à nicotina durante e após a gestação de roedores pode ter um efeito adverso sobre os órgãos vitais da prole através da alteração do equilíbrio oxidante/antioxidante dos tecidos. Fígado e rim parecem ser os órgãos mais afetados possivelmente devido a seus principais papéis no metabolismo da nicotina.

Trabalhos feitos em animais têm também encontrado que alterações resultantes da exposição pré-natal podem afetar a susceptibilidade ao uso do tabaco ou etanol mais tarde entre os filhotes expostos. Animais expostos durante toda a gestação à nicotina juntamente com o álcool, adquiriram o comportamento de auto-administração de nicotina quando adolescentes, mais rapidamente e em um percentual e dosagens mais elevadas, que as proles controle ou que receberam somente nicotina ou etanol (Barbier et al. 2009). Em outro estudo (Christensen et al, 2015), a exposição à nicotina foi capaz de induzir alterações nas células colinérgicas do núcleo tegumentar laterodorsal (LDT) que seriam esperados para alterar a excitabilidade celular. Essas alterações podem contribuir para a suscetibilidade tardia à nicotina em indivíduos expostos durante a gestação. Estudos eletrofisiológicos realizados em células de animais que haviam sido previamente expostos à nicotina durante o desenvolvimento demonstraram alterações tardias no potencial de membrana em repouso de células colinérgicas do sistema de ativação reticular (RAS), sugerindo que a exposição pré-natal induz alterações nestas células (Good et al., 2006).

Álcool

Bebidas alcoólicas são amplamente consumidas em todo o mundo. O álcool é a substância psicoativa mais utilizada pela sociedade (Bau, 2002), consumido em grandes doses podendo, além de gerar vício, exercer efeitos prejudiciais em diversos órgãos e sistemas do organismo, como por exemplo, no fígado, sistema cardiovascular, rins e inclusive no sistema nervoso (McGinnis e Foege, 1993). O consumo de álcool é o terceiro maior fator de risco do mundo para doenças e incapacidade. O álcool é o fator causal de 60 tipos de doenças e lesões e uma causa componente em 200 outras. Em torno de 4% de todas as mortes no mundo são atribuídas ao álcool, mais do que as mortes causadas por HIV/AIDS, violência ou tuberculose. Também está associado com diversas questões sociais graves, como a violência, negligência infantil e abuso e absentismo no local de trabalho. Estima-se que o consumo de álcool seja a causa de 20% a 50% dos casos de cirrose hepática, epilepsia, intoxicações, acidentes rodoviários, violência e diversos tipos de câncer. É o terceiro maior risco para a doença e incapacidade, após baixo peso na infância e sexo inseguro. Apesar de campanhas alertarem sobre os riscos do consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação, o número de casos envolvendo indivíduos com sequelas decorrentes deste consumo durante a gestação tem se mantido relativamente estável ao longo dos últimos anos (Cudd, 2005; Spohr *et al.* 2007).

A maior parte do etanol é metabolizada pelo fígado em acetaldeído através da enzima álcool desidrogenase, sendo de 2 a 10% apenas eliminado de modo inalterado pela urina, respiração e suor. Em média, na população geral, a álcool desidrogenase diminui a concentração do etanol no sangue em torno de 5 mmol/L de etanol por hora, o que corresponde a um drinque por hora (Schuckit, 2006). O acetaldeído é um composto reativo e tóxico, que promove hepatotoxicidade e também pode contribuir para os efeitos do consumo de etanol sobre o sistema nervoso (Hunt, 1996; Quertemont et al., 2005; Deng e Deitrich, 2008). Quase todo acetaldeído é convertido em acetato no fígado pela enzima aldeído desidrogenase. Os polimorfismos dessas enzimas têm sido estudados como possíveis preditores genéticos para a susceptibilidade do indivíduo apresentar vício pelo etanol (Dickson et al., 2006; Duranceaux et al., 2006). Tão importante quanto, o etanol apresenta como sítios de ação uma grande variedade de alvos nas membranas celulares, como também, cascatas de sinalização intracelulares.

A exposição ao álcool durante a gestação pode acarretar diversos transtornos que podem persistir por um longo período da vida do indivíduo (Hannigan e Armant, 2000; Spohr *et al.*, 2007; Welch-Carre, 2005). Como mencionado acima, atualmente, a sigla FASD é utilizada internacionalmente para descrever o complexo quadro clínico de manifestações diversas, decorrentes da exposição ao etanol durante o período da gravidez. Tais manifestações caracterizam-se por um grupo de sinais e sintomas relacionados ao comprometimento do sistema nervoso central e de outros órgãos (Lima, 2008). Estes sintomas podem ser físicos, mentais (Figura 1) (Riley e McGee, 2005). A FASD pode incluir alterações comportamentais como a hiperatividade (Burd *et al.*, 2003), o déficit de atenção (Burden *et al.*, 2005), danos no processamento visual (Uecker e Nadel, 1996), comportamento autista (Harris *et al.*, 1995) e déficits de aprendizado e memória (Rasmussen, 2005) entre outras.

Figura 1. Alterações faciais observadas na FASD.



Nota: Complexo quadro clínico de manifestações diversas, decorrentes da exposição ao etanol durante o período da gravidez.

Fonte: <https://www.tuasaude.com/sindrome-do-alcoolismo-fetal/>

A FASD compreende um amplo espectro de alterações que podem se manifestar em diferentes fases da vida do indivíduo (tabela 2). A severidade das alterações varia de indivíduo para indivíduo e algumas podem alterar seu padrão de manifestação em função da idade do indivíduo (Banakar *et al.*, 2009).

Tabela 2. Características da FASD relacionadas a idade

Recém-nascidos	Início da infância/ pré-escola	Meio da infância	Adolescência e idade adulta
Dificuldades para dormir e se alimentar	Falante e amigável	Pequeno para idade	Características faciais podem desaparecer
Fraqueza, enjôo, irritabilidade e tremores	Acessos de fúria	Impulsividade e déficit de atenção	Baixo desempenho escolar
Choro excessivo	Hiperatividade	Pouca interação social	Julgamento prejudicado, problemas comportamentais
Hipersensibilidade a luz e som	Pequeno para idade	Dificuldade de aprendizado	Dificuldade de relacionamento
Convulsões	Atraso na fala	Déficits de linguagem	Maior propensão ao uso de substâncias de abuso e depressão
Atraso no desenvolvimento	Anormalidades em movimentos finos	Falta de organização	Dificuldade com atividades do dia-a-dia
	Retardo mental	Pensamento abstrato deficiente	Retardo mental
		Retardo mental	

Fonte: Modificado de BANAKAR et al., 2009.

Vários estudos com crianças com FASD mostram que estas apresentam déficits motores no equilíbrio postural (Roebuck *et al.*, 1998a), na coordenação dos olhos e mãos (Adnams *et al.*, 2001) e tarefas complexas onde se usam as duas mãos (Roebuck-Spencer *et al.*, 2004). Estudos não clínicos de desempenho motor em bebês e crianças que foram expostas ao álcool no período pré-natal, demonstraram um déficit médio da performance locomotora, começando nos primeiros dias de vida e se prolongando até os dois anos (Connor *et al.*, 2006, Kaplan-Estrin *et al.*, 1999) como também, um prejuízo na coordenação motora fina e grossa na infância (Lucas *et al.*, 2014).

A magnitude dos efeitos teratogênicos do álcool vai depender e variar em função de fatores como idade dos indivíduos expostos, da intensidade, da frequência e da duração das exposições, além de fatores genéticos (Chiodo *et al.*, 2010, Burden *et al.*, 2005, Maier e West, 2001; Hannigan e Berman 2000; Klintsova *et al.* 2000; Riley e McGee, 2005). Fatores ambientais como a condição sócio-econômica, fatores nutricionais e aumento do estresse também podem interferir com os efeitos teratogênicos do álcool (Welch-Carre, 2005; Riley e McGee, 2005; Hannigan *et al.*, 2007). Além disso, o período de exposição irá determinar quais estruturas em desenvolvimento serão afetadas e quão severamente elas serão afetadas. Conseqüentemente, nem todos os indivíduos expostos a quantidades similares de etanol durante

a gestação terão as mesmas sequelas. Alguns indivíduos poderão ter diversos sistemas afetados severamente enquanto outros não apresentarão efeitos aparentes (Riley e McGee, 2005).

A exposição pré-natal ao álcool durante o primeiro trimestre de gestação interfere com a migração, a proliferação e a organização celular cerebral tanto em humanos como em roedores (Cook *et al.*, 1990; Miller; 1996). Os efeitos deletérios do etanol durante este período do desenvolvimento parecem ser a causa mais provável das alterações craniofaciais encontradas em indivíduos expostos ao etanol durante o desenvolvimento (Goodlet e Horn, 2001). As dismorfias faciais aparecem apenas quando altas concentrações sanguíneas de etanol ocorrem durante o período de gastrulação (Sulik, 2005). De fato, camundongos expostos durante o período equivalente ao primeiro trimestre em humanos podem apresentar severas malformações faciais e cerebrais (Kotch e Sulik, 1992). Camundongos expostos ao álcool no sétimo (E7) ou oitavo (E8) dia embrionário (Sulik, 2005) e macacos do velho mundo expostos ao álcool no décimo nono (E19) ou vigésimo (E20) dia embrionário (Astley *et al.*, 1999) exibem dismorfias faciais semelhantes as identificadas em humanos. A intensidade destas malformações poderá incluir a presença de lábio leporino uni ou bilateral, nariz e região maxilar pequenos, fenda facial medial e ausência de narinas (Riley e McGee, 2005).

Apesar das características faciais serem os sintomas mais evidentes em indivíduos que foram expostos ao álcool durante a gestação, as conseqüências mais devastadoras são aquelas relacionadas às alterações cerebrais e alterações comportamentais (Riley e McGee, 2005). Durante o terceiro trimestre de gestação em humanos, estruturas como o cerebelo, o hipocampo e o córtex pré-frontal são particularmente sensíveis aos efeitos do etanol (Coles *et al.*, 1991; West e Pierce, 1986). De fato, roedores expostos ao etanol no período do desenvolvimento correspondente ao terceiro trimestre de gestação em humanos reproduzem as alterações encontradas em humanos como microcefalia (Chen *et al.*, 2003) e perda neuronal no hipocampo e no cerebelo (West *et al.*, 1986, Bauer-Moffett e Altman, 1977; Goodlett *et al.*, 1990; Ryabinin *et al.*, 1995). A excessiva morte neuronal altera o desenvolvimento normal de redes neurais e pode levar a disfunções cognitivas e comportamentais tanto em humanos como em animais (Chen *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que roedores expostos ao etanol durante o desenvolvimento reproduzem alterações comportamentais encontradas em humanos expostos ao etanol durante o desenvolvimento. Dentre estas, podemos citar a hiperatividade, os déficits de atenção, os déficits de aprendizado e memória (Driscoll *et al.*, 1990), além de alterações nos níveis de ansiedade (Ohta *et al.*, 2010).

Uma das consequências marcantes da administração de etanol em ratos e camundongos durante os 10 primeiros dias de vida pós-natal é um grande aumento na morte neuronal por apoptose em diversas regiões cerebrais (Ikonomidou et al., 2000; Ikonomidou, 2009; Olney, 2004). Atualmente, é bem aceita a idéia de que a apoptose induzida pelo etanol é mediada pela ativação da caspase-3 e é causada pela combinação do bloqueio dos receptores NMDA e da hiperativação dos receptores GABAA (Nowoslawski et al., 2005; Olney et al., 2002; Olney, 2004). Consistente com esta idéia, a administração de bloqueadores específicos dos receptores NMDA como a dizocilpina (MK801) (Ikonomidou et al., 2000) e agonistas do receptor GABAA como o muscimol (Nunez e McCarthy, 2004) produzem aumento da apoptose durante o período de surto de crescimento cerebral. Com base no fato de que a perda de neurônios durante o período de intensa sinaptogênese pode prejudicar a formação das futuras redes neurais, alguns autores têm sugerido que a neuroapoptose induzida pela exposição gestacional ao etanol seja um dos mecanismos envolvidos nos distúrbios neurocomportamentais observados na FASD como o TDAH e os déficits de memória e aprendizado (Han et al., 2005; Ieraci e Herrera, 2006; Medina, 2011a; Wozniak et al., 2004). Contudo, há também fortes evidências que distúrbios na plasticidade neural podem ser responsáveis por algumas alterações causadas pelo etanol (Medina *et al.* 2003; Medina e Ramoa, 2005; Goodlett *et al.* 2005; Medina *et al.* 2006; Hannigan *et al.* 2007).

O co-abuso

Estudos epidemiológicos apontam para uma forte relação entre o fumo e o consumo de etanol, de forma que a co-ocorrência de alcoolismo e tabagismo é muito frequente (Miller et al., 1998; Larsson e Engel, 2004; Schlaepfer et al. 2008), o que sugere que o co- uso e co-abuso de tabaco e etanol ocorram com frequência também durante a gravidez.

Aproximadamente metade da população alcoolista fuma (Sobell et al., 1990; Grant et al., 2004). A cessação espontânea do tabagismo é infreqüente entre indivíduos alcoolistas (Falk et al., 2006, Hintz e Mann, 2007) e até 75% dos fumantes alcoolistas requerem tratamento para ambas as dependências (Grant et al., 2004). Ao lado disso, o consumo de etanol entre fumantes é duas vezes maior do que entre os não fumantes (Carmody et al., 1985) e estima-se que o alcoolismo seja de 10 a 14 vezes mais comum entre fumantes quando comparados com não fumantes (Di Franza e Guerrera, 1990), além do consumo diário de cigarros por alcoolistas ser maior do que o consumo por fumantes não alcoolistas (Rezvani e Levin, 2002).

O fato do consumo de etanol e o tabagismo serem legalmente permitidos pode contribuir para o co-abuso. Entretanto, tem crescido o número de estudos que indicam que fatores biológicos podem contribuir para explicar a freqüente associação do uso entre as duas drogas. O uso de drogas de abuso é motivado por diversos fatores, incluindo experimentação, pressão de companheiros, auto-medicação para problemas psicológicos (por exemplo, ansiedade e depressão) e dependência. Consequentemente, a forte associação entre o consumo de álcool e de cigarros está provavelmente atribuída a múltiplos fatores, incluindo ações farmacológicas comuns a ambos (Little, 2000). Muitos mecanismos têm sido sugeridos, como por exemplo: uma droga pode promover um aumento da motivação para o consumo de outra droga por atuar em um mesmo alvo cerebral responsável pelo efeito de reforço positivo de ambas as drogas; a geração de tolerância cruzada poderia reduzir os efeitos aversivos da droga e motivar as pessoas a usarem outras drogas que gerem o mesmo efeito de recompensa. Além disso, estudos sugerem que componentes genéticos podem predispor o uso combinado do etanol e do tabaco (Funk et al., 2006).

Devido a grande complexidade que pode envolver estudos que analisam a interação entre tabaco e etanol, a existência de modelos animais é de extrema importância para estudar as interações fisiológicas. Em animais experimentais, há muita informação sobre efeitos da exposição pré-natal à nicotina (um dos principais componentes da fumaça de cigarro), mas só recentemente os efeitos da combinação entre a nicotina e o etanol começaram a ser descritos (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008; Basta et al., 2000; Matta e Elberger, 2007; McMurray et al., 2008; Oliveira-da-Silva et al., 2009, 2010; Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009).

A exposição combinada a nicotina e ao etanol afeta memória e aprendizado, níveis de ansiedade e o sistema colinérgico central de forma diferenciada dos efeitos da exposição isolada à nicotina ou ao etanol, o que indica que estas drogas interagem, afetando o funcionamento do sistema nervoso central durante o seu desenvolvimento. Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa onde era utilizado um modelo de exposição concomitante a etanol e a nicotina na adolescência de camundongos, encontramos que o etanol promove diminuição da ansiedade na adolescência desses animais e que a nicotina pode reverter este efeito. Além disso, este estudo indicou que o etanol e a nicotina podem interagir após longo tempo de retirada na idade adulta, promovendo aumento da ansiedade (Abreu-Villaça et al., 2008). Também observamos interação entre as drogas na memória/aprendizado através do teste da esQUIVA passiva, teste amplamente utilizado para se avaliar este comportamento. Demonstramos que a nicotina e o etanol quando expostos concomitantemente promovem danos na memória significativamente maiores do que quando cada droga é administrada isoladamente também em camundongos

adolescentes (Abreu-Villaça et al., 2007). Neste mesmo estudo, também se verificou que após pequeno tempo de retirada, a nicotina promoveu melhora na memória/aprendizado, mas que este efeito foi bloqueado pelo uso concomitante do etanol. Além disso, enquanto o etanol impede a atenção sustentada e a memória recente durante sua exposição e retirada em ratos (Çelik et al., 2005; Givens, 1997; Givens e McMahon, 1997), bem como a capacidade de atenção em humanos (Koelega, 1995; Parsons e Nixon, 1998), a co-administração de nicotina mostra uma ação preventiva aos efeitos do etanol em animais experimentais (Tracy et al., 1999). Em relação à neurotoxocidade, foi observado que o etanol promove aumento da morte celular em todas as áreas do hipocampo de camundongos adolescentes, sendo ambas as populações de neurônios e glia afetados, enquanto que a nicotina causa aumento seletivo da morte celular, sendo as camadas molecular e CA1 afetadas. Neste estudo também houve interação de efeitos quando as duas drogas foram expostas simultaneamente, só que neste caso, a exposição combinada promoveu efeitos menos severos na morte celular (Oliveira-da-Silva et al., 2009).

Em relação ao comportamento tipo depressivo, estudo recente analisou o tempo de imobilidade de camundongos no teste do nado forçado e a condição de anedonia, um dos componentes do comportamento tipo depressivo. Observaram que fêmeas expostas ao etanol isoladamente apresentavam redução no tempo de imobilidade ao final da exposição enquanto, durante longo tempo de retirada da droga o tempo de imobilidade aumentou. Durante curto período de retirada das drogas, o aumento do tempo de imobilidade somente foi demonstrado em camundongos fêmeas expostos a nicotina isoladamente. Em relação a condição de anedonia, machos de ambos os grupos, que receberam nicotina e que receberam nicotina e etanol juntamente mostraram aumento do consumo de sacarose, sugerindo um efeito de recompensa durante o curto período de retirada. O mesmo foi observado no longo período de retirada, porém somente em machos expostos a nicotina isoladamente (Ribeiro-Carvalho et al., 2011).

Em estudo realizado em 2009 avaliaram-se os efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol no sistema colinérgico durante a adolescência, foi demonstrado que nicotina e o etanol interagem resultando em alterações durante a exposição e durante a retirada das drogas. Ao final da exposição, os animais expostos as duas drogas concomitantemente apresentaram suprarregulação de nAChRs, refletindo simples somação dos efeitos destas drogas no córtex cerebral e sinergismo no mesencéfalo. A suprarregulação devido à exposição combinada foi mantida mesmo após alguns dias de retirada das drogas. Quanto à atividade da colina acetiltransferase, enzima que sintetiza a ACh, durante a exposição, machos que receberam somente nicotina apresentaram aumento da atividade no córtex cerebral, mas o etanol foi capaz de reverter este efeito. Ao contrário, fêmeas que receberam também só nicotina apresentaram

diminuição da atividade. No mesencéfalo, somente etanol promoveu aumento da atividade. Já alguns dias do término da exposição, animais que receberam somente nicotina apresentaram aumento na atividade que foi revertido na retirada combinada das drogas. Um mês após o término da exposição, animais expostos a nicotina e etanol apresentaram redução da atividade. Animais que receberam etanol e animais que receberam as duas drogas juntas apresentaram redução da marcação alguns dias após a retirada das drogas, a qual persistiu até um mês após o término da exposição (Ribeiro-Carvalho et al., 2009).

A maior parte dos estudos descritos acima expuseram os animais as drogas de abuso na idade adulta ou na adolescência. Há grande carência de estudos que descrevam os efeitos da combinação entre nicotina e etanol durante períodos precoces do desenvolvimento.

Durante a gravidez na adolescência, 58% dos fumantes também bebem álcool (Cornelius et al., 2007). Evidências epidemiológicas mostram uma correlação positiva entre o consumo de tabaco materno e o consumo de álcool no comportamento subsequente de consumo dessas drogas na prole. Roedores expostos durante a gravidez e vida pós-natal recente à nicotina e ao etanol adquiriram auto-administração de nicotina mais rapidamente na idade adulta, em uma porcentagem maior e em um nível mais alto quando comparado aos outros grupos, resultando em uma maior auto-administração de nicotina nos filhotes quando adultos jovens (Matta et al., 2007). De acordo com os dados anteriores, estudo em modelo animal demonstrou que a exposição gestacional à nicotina e/ou etanol aumentou a auto-administração de nicotina em comparação com o controle, corroborando a hipótese de que a exposição gestacional a nicotina mais etanol perturba o controle dos circuitos dopaminérgicos por receptores NMDA da área tegmental ventral, aumentando a autoadministração de nicotina e a liberação dopaminérgica no núcleo accumbens dos adolescentes. Estes resultados demonstram que ratos adolescentes expostos a nicotina e etanol durante a gestação apresentam acentuadamente maior vulnerabilidade para se tornarem dependentes da nicotina, o que reflete a função aumentada da subpopulação de receptores NMDA da área tegmental do tegmento ventral que conferem maior liberação de dopamina induzida por nicotina no núcleo accumbens accumbente (Roguski et al, 2014).

Plasticidade neural

Plasticidade sináptica é a capacidade que o cérebro tem de modificar sua estrutura e função em resposta a experiências ou estímulos ambientais (Rapoport e Gogtay, 2008; Hannigan *et al.*, 2007). Esta habilidade é essencial durante o desenvolvimento, quando os circuitos neurais são refinados (Lamprecht e Ledoux, 2004). O ambiente desempenha importante papel no desenvolvimento de circuitos neurais e existem inúmeras evidências da influência de atividades dependentes de experiência na formação dos padrões sinápticos (Hebb, 1949; Changeux e Danchin, 1976; Kandel *et al.*, 2000). Uma ativação repetitiva (em resposta a estímulos externos) de sinapses excitatórias aumenta a eficiência destas sinapses em diversas regiões cerebrais, fenômeno conhecido como LTP (*long term potentiation*) ou potenciação de longa duração. A LTP, um dos exemplos de plasticidade sináptica, apresenta diversas características que a tornam uma forte candidata para o mecanismo do armazenamento de memória de longo prazo: ambos o LTP e a memória de longo prazo são acionados rapidamente, dependem da síntese de proteínas e são mantidos por longos períodos (Malenka e Nicoll, 1999).

Alguns autores sugerem que o aumento da ativação dos receptores NMDA pode levar a um aumento da plasticidade (Crair e Malenka, 1995; Crair, 1999). Os receptores NMDA possuem permeabilidade ao cálcio. Quando a membrana do neurônio se encontra em repouso, os receptores NMDA permanecem bloqueados por íons de magnésio. Quando esta é suficientemente despolarizada, o magnésio é deslocado e quantidades grandes de cálcio entram na célula (Flores-Soto *et al.*, 2012, Low e Wee, 2010). Esse aumento de cálcio é responsável pela ativação de uma série de enzimas dependentes de cálcio, como a calmodulina dependente de cinase II (CaMKII), que regula a expressão de uma série de fatores de transcrição que por sua vez, regulam a expressão gênica de genes relacionados com mecanismos de plasticidade e processos importantes para o desenvolvimento (Wang *et al.*, 2011). No desenvolvimento cerebral, o aumento intracelular de cálcio decorrente da ativação dos receptores NMDA estimula o crescimento axonal (Wang *et al.*, 2011), dendrítico (Henle *et al.*, 2012) e participa da formação e estabilização de sinapses (Gambrill e Barria, 2011). A ativação também provoca a liberação de neurotrofinas, como por exemplo o fator neurotrófico derivado do encéfalo (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) que estão envolvidas no controle da formação e maturação das sinapses (Barneda-Zahonero *et al.*, 2012).

A atividade excitatória de neurônios glutamatérgicos é modulada também por interneurônios que têm como principal neurotransmissor o GABA e promovem uma importante

sinalização inibitória para o desenvolvimento de redes neurais (Zhang, 2006). Adicionalmente, estudos sugerem que a neurotrofina BDNF influencia na liberação da GABA promovendo uma mobilização dos canais de cálcio pré-sinápticos próximo aos sítios de liberação das vesículas (Woo e Lu, 2006). Desta forma, uma supra ou infra-regulação dos canais de cálcio em neurônios glutamatérgicos ou gabaérgicos parece ser um mecanismo central para neuroplasticidade (Rapoport e Gogtay, 2008).

Os mecanismos moleculares envolvidos com a plasticidade adaptativa/compensatória, que é a capacidade do cérebro se recuperar ou readaptar a danos (Rapoport e Gogtay, 2008), ainda não são totalmente conhecidos. A maioria das estruturas cerebrais durante o desenvolvimento requer modificações na expressão gênica e produção de proteínas (Lamprecht e Ledoux, 2004). Alguns estudos tem demonstrado que a cascata de sinalização envolvendo o segundo mensageiro AMPc, a proteína quinase A (PKA) e a proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/ Ca^{++} (CREB) é importante para diversos processos relacionados a plasticidade neuronal como a dominância ocular (Mower *et al.*, 2002; Beaver *et al.*, 2001; Pham *et al.*, 1999), o LTP, o aprendizado e a memória (Frank e Greenberg, 1994; Finkbeiner *et al.*, 1997; Lamprecht, 1999). Adicionalmente, estudos têm demonstrado evidências que a via de sinalização envolvendo GMPc pode promover plasticidade sináptica e consolidação da memória, em parte pela ativação da cascata de sinalização MEK/ERK/CREB, uma cascata de sinalização envolvida em processos de consolidação de memória (Atkins *et al.*, 1998; Schafe *et al.*, 2000; Josselyn *et al.*, 2001).

Fosfodiesterases e seus inibidores

As fosfodiesterases (PDEs) são enzimas que regulam os níveis celulares de segundos mensageiros, AMPc e GMPc, controlando suas taxas de degradação. Existem 11 famílias de PDEs, cada uma com diversas isoformas (Bender e Beavo, 2006; P.R.A. Heckman et al, 2015) sendo agrupadas em famílias de acordo com a especificidade de seus substratos, que podem ser o AMPc, o GMPc ou ambos (Kakkar *et al.*, 1999) (Tabela 3). Estes nucleotídeos cíclicos desempenham um importante papel na sinalização intracelular (Son *et al.*, 1998; Chien *et al.*, 2003) e em processos de neuroplasticidade (Blokland *et al.*, 2006). As PDEs se diferenciam por suas estruturas tridimensionais, propriedades cinéticas, formas de regulação, localizações intracelulares, expressões celulares e diferentes sensibilidades a inibidores. São enzimas fosfodiolases que catalizam seletivamente a hidrólise da ligação do fosfato cíclico da adenosina, no caso do AMPc e guanosina em relação ao GMPc (Bender e Beavo, 2006).

Tabela 3. Tipos de fosfodiesterases presentes no sistema nervoso.

Type	Genes	Property	Substrate
PDE1	A, B, C	Ca ²⁺ -CaM-stimulated	cAMP/cGMP
PDE2	A	cGMP-stimulated	cAMP/cGMP
PDE3	A, B	cGMP-inhibited	cAMP/cGMP
PDE4	A, B, C, D	cAMP-specific	cAMP
PDE5	A	cGMP-specific	cGMP
PDE6	A, B, C	Photoreceptor	cGMP
PDE7	A, B	cAMP high affinity	cAMP
PDE8	A, B	cAMP high affinity	cAMP
PDE9	A	cGMP high affinity	cGMP
PDE10	A	cAMP-inhibited	cAMP/cGMP
PDE11	A	Dual substrate	cAMP/cGMP

Legenda: PDE: Fosfodiesterase. cAMP: Adenosina Monofosfato Cíclico. cGMP: Guanosina Monofosfato Cíclico. Ca²⁺: Cálcio. CaM: Calmodulina.

Fonte: Bender & Beavo, 2006.

Em relação a localização das diferentes PDEs no cérebro de roedores e humanos, a tabela 4 fornece uma breve visão geral com base na expressão de RNA mensageiro e histoquímica *in situ* (Pérez-Torres et al., 2000; Lakics, Karran, & Boess, 2010; P.R.A. Heckman et al, 2015).

Tabela 4. Localização das diferentes fosfodiesterases (PDEs) no cérebro de roedores e humanos na idade adulta.

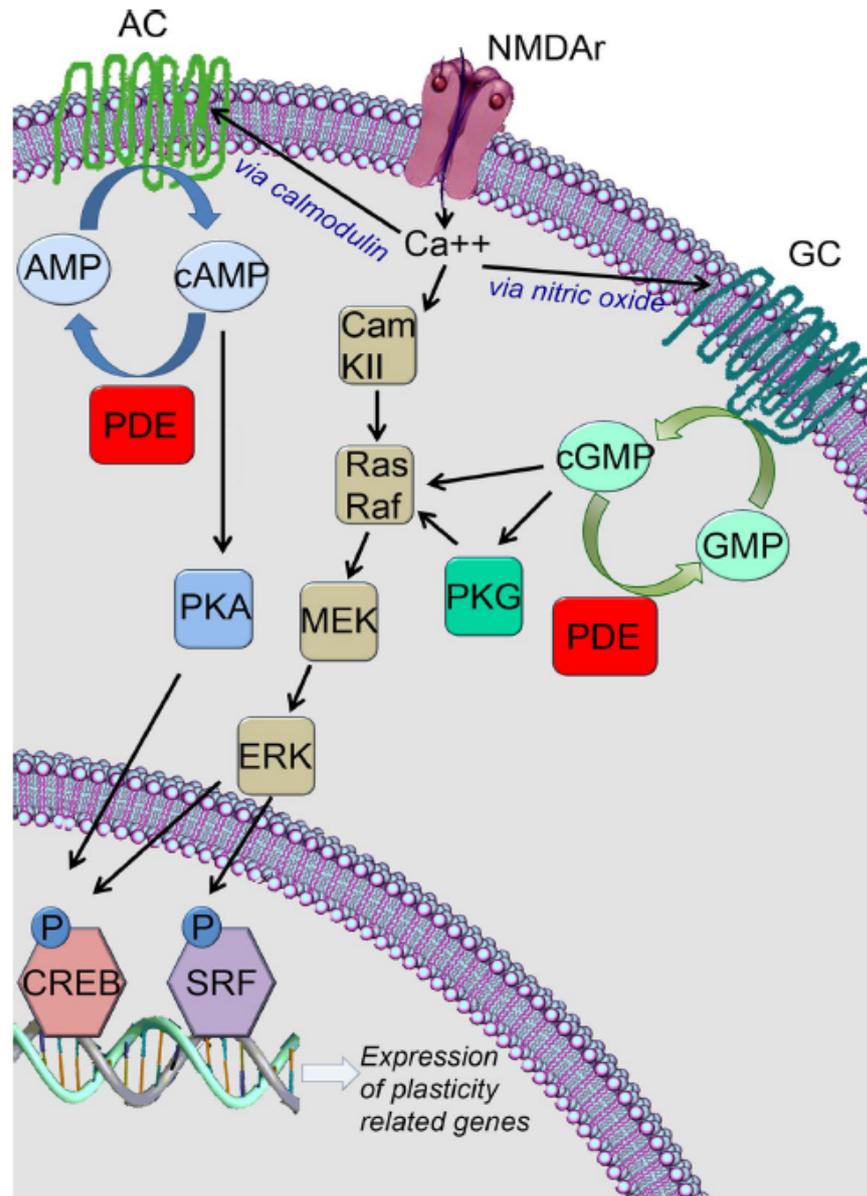
PDE	Localization in the brain
PDE1A-C	Hippocampus, cortex, olfactory bulb, striatum (highest expression levels), thalamus, amygdala, cerebellum; expression levels are in general highest for 1A and lowest for 1C
PDE2A	Hippocampus, cortex, striatum, hypothalamus, amygdala, midbrain
PDE3	Throughout the brain low expression levels
PDE4A-D	Hippocampus, cortex, olfactory bulb, striatum, thalamus, hypothalamus, amygdala, midbrain, cerebellum; expression levels are in general highest for 4A-4D (differs per brain structure) and lowest for 4C
PDE5A	Hippocampus, cortex, cerebellum
PDE6	Pineal gland
PDE7A-B	Hippocampus, cortex, olfactory bulb, striatum, thalamus, hypothalamus, midbrain; expression levels are in general highest for 7B
PDE8A-B	Hippocampus, cortex, olfactory bulb, striatum, thalamus, hypothalamus, midbrain; expression levels are in general highest for 8B
PDE9A	Hippocampus, cortex, olfactory bulb, striatum, thalamus, hypothalamus, amygdala, midbrain, cerebellum
PDE10A	Hippocampus, cortex, striatum (highest expression levels), midbrain, cerebellum
PDE11A	Throughout the brain low expression levels

Legenda: PDE: Fosfodiesterase.

Fonte: Adaptado de Prickaerts, 2010, baseado em Lakics et al., 2010; Pérez-Torres Et al., 2000.

Estudos têm demonstrado que os inibidores da PDE melhoram processos relacionados à neuroplasticidade como a memória e o aprendizado em diversas espécies como camundongos (Bourtchouladze *et al.*, 2003), ratos (Goodlett e Peterson, 1995) e humanos (Blokland *et al.*, 2006). Os efeitos destes inibidores têm sido atribuídos a um aumento nos níveis de AMPc ou GMPc, os quais, por sua vez, podem ativar os fatores de transcrição como SRF (*Serum Response Factor*) e CREB levando à expressão de genes relacionados à plasticidade (Barad *et al.*, 1998; Blokland *et al.*, 2006; Medina, 2010) (Figura 2).

Figura 2. A inibição da fosfodiesterase de tipo 1 (PDE1) leva ao aumento de cAMP e cGMP e, finalmente, à expressão de genes relacionados com a plasticidade.

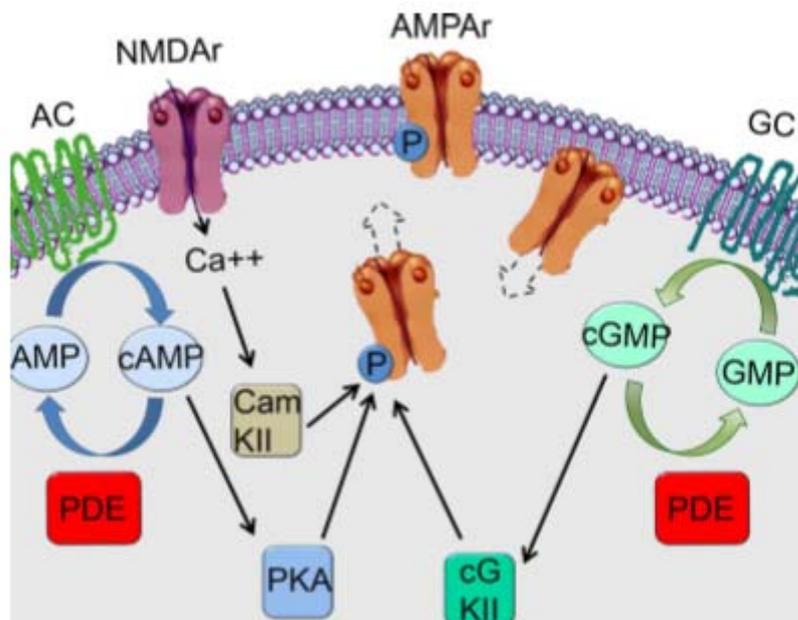


Legenda: PDE: Fosfodiesterase. CREB: Proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/ Ca^{++} . SRF: *Serum Response Factor*. Ca^{++} : Cálcio. ERK: Quinases Reguladoras de sinais Extracelulares. MEK: Proteína quinase quinase ativada mitoticamente. PKG: Proteína Quinase G. cGMP: Guanosina Monofosfato. cAMP: Adenosina Monofosfato Cíclico. CamCalmodulina. NMDA: N-metil-D-aspartato. AC: Adenil Ciclase. Gc: Guanilato Ciclase.
 Fonte: MEDINA, 2011.

A cascata mostrada acima, na figura 2, está relacionada com a plasticidade neuronal, uma propriedade essencial do cérebro que está comprometida em diferentes condições

neurológicas (Medina, 2011). Os inibidores da fosfodiesterase do tipo 1 (PDE1) podem aumentar os níveis dos segundos mensageiros cAMP / cGMP levando à expressão de genes relacionados com a plasticidade neuronal, fatores neurotróficos e moléculas neuroprotetoras.. A transmissão glutamatérgica conduz a um aumento dos níveis de Ca^{++} intracelular e cAMP / cGMP desencadeando cascatas que irão conduzir, em última instância, à fosforilação e ativação CREB e SRF. A ativação de CREB e/ou SRF pode levar à expressão de genes relacionados à plasticidade, os quais, por sua vez, promovem as alterações funcionais e morfológicas necessárias para que ocorra a plasticidade neuronal (Frank e Greenberg, 1994; Atkins et al., 1998; Silva et al., 1998; Josselyn e Nguyen, 2005; Etkin et al., 2006; Pintchovski et al., 2009), como a alteração dos complexos protéicos do citoesqueleto (Lavour et al., 2008) e a remodelação das espinhas dendríticas (Suzuki et al., 2007). CREB é uma das moléculas mais importantes nos processos de plasticidade neuronal e é crucial para vários paradigmas, como a LTP (Barco et al., 2002; Bourtchouladze et al., 2003), aprendizagem e memória (Frank e Greenberg, 1994; Silva et al., 1998; Lamprecht, 2005) e plasticidade do córtex barril (Glazewski et al., 1999). Estudos recentes demonstraram que o SRF também está implicado na plasticidade neuronal e está relacionada com a formação de memória espacial (Tyan et al., 2008), LTP (Ramanan et al., 2005) e LTD (Etkin et al., 2006) . Outra forma que a inibição de PDE pode melhorar a plasticidade neuronal é através da potenciação da transmissão glutamatérgica (Figura 3). O aumento dos níveis de cAMP / cGMP causados pela inibição da PDE1 pode levar à fosforilação dos receptores AMPA promovendo a sua incorporação na sinapse (Serulle et al., 2007) e levando à facilitação da transmissão glutamatérgica. Os receptores AMPA podem mover-se para dentro e para fora da membrana sináptica afetando a transmissão glutamatérgica tornando os receptores NMDA funcionais (Malinow e Malenka, 2002). No potencial de membrana em repouso, o receptor de NMDA é bloqueado por Mg^{++} (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). No entanto, a ativação dos receptores AMPA pode despolarizar a membrana pós-sináptica, libertando o bloqueio Mg^{++} e tornando o receptor NMDA funcional. Deste modo, a ativação do receptor de NMDA pode ser facilitada ou reduzida respectivamente pela inserção ou remoção de receptores AMPA na ou da membrana pós-sináptica (Malinow e Malenka, 2002; Malenka e Bear, 2004).

Figura 3. A inibição da fosfodiesterase de tipo 1 pode levar à fosforilação dos receptores AMP e sua incorporação à sinapse.



Legenda: PKA: Proteína Quinase A. AC: Adenil Ciclase. GC: Guanilato-Ciclase. AMPA: Alfa-amino 3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico.

Fonte: MEDINA, 2011.

A ativação de CREB pode levar à expressão de muitas moléculas neuroprotetoras e antiapoptóticas. É bem conhecido que a inibição de fatores neurotróficos pode induzir apoptose e inversamente, que a expressão destas moléculas pode impedir o efeito de fatores pró-apoptóticos (Raff et al., 1993). A este respeito, a fosforilação de CREB pode conduzir à expressão de muitos fatores neurotróficos protetores tais como BDNF, FGF e TGF (Lonze e Ginty, 2002).

Dentre os inibidores das PDEs destaca-se a vimpocetina um alcalóide extraído da mirta, inibidor não específico da PDE1 (Medina, 2010). Os alcalóides da mirta são utilizados no tratamento da demência (Nicholson, 1990) e a vimpocetina em particular possui propriedades farmacológicas como aumentar o fluxo sanguíneo cerebral (Caravaggi *et al.*, 1977; Lacroix *et al.*, 1979), estimular o metabolismo cerebral (Lacroix *et al.*, 1979; Shibota *et al.*, 1982), modular a liberação de neurotransmissores (Rosdy *et al.*, 1976) e ainda possui propriedades anti-inflamatórias (Teixeira *et al.*, 1994; Medina, 2010).

As PDE1s são cálcio e cálcio-calmodulina dependentes (Cheung, 1970). Receberam esta nomenclatura por terem sido uma das primeiras famílias de PDE a ter o mecanismo de regulação identificado e também pelo fato de numa cromatografia de separação de membranas

de tecidos em colunas aparecerem como o primeiro pico de atividade das PDEs (Bender e Beavo, 2006). Suas 3 isoformas PDE1A, PDE1B e PDE1C são expressas em diferentes tipos celulares em diferentes tecidos e regiões do organismo, inclusive no cérebro (Bender e Beavo, 2006). Dentre as PDEs presentes no cérebro, a PDE1A e a PDE1B correspondem a mais de 90% da atividade destas enzimas (Kakkar *et al.*; 1999). As PDE1s apresentam tanto AMPc como GMPc como substrato (Blokland *et al.*, 2006) e a principal característica que distingue esta família das outras é sua regulação pela Ca^{+} /calmodulina (CaM).

Alguns estudos tem demonstrado a eficácia dos inibidores da fosfodiesterase como potencializadores da plasticidade neuronal. Utilizando uma combinação de técnicas de imagem eletrofisiológica e óptica, ficou demonstrado que a vimpocetina restaura a plasticidade da dominância ocular em furões que sofreram exposição fetal ao álcool (Medina et al, 2006). O córtex visual primário de furões expostos ao álcool durante o terceiro trimestre equivalente da gestação humana, tiveram diminuição da fosforilação do CREB e redução da seletividade de orientação. O tratamento desses animais expostos ao álcool com vimpocetina, dias após o período de exposição, aumentou a fosforilação do CREB e restaurou a função de seletividade para orientação do estímulo visual (Krahe et al, 2009).

A exposição precoce ao álcool afeta memória visuo-espacial e causa hiperatividade na adolescência e idade adulta e estudos recentes demonstram que o tratamento agudo com vimpocetina restabelece a memória/aprendizado, a atividade locomotora e os níveis de AMPc dos animais expostos precocemente ao etanol (Filgueiras et al., 2010; Nunes et al., 2011). Estes dados fornecem evidências para o potencial uso terapêutico da vimpocetina no FASD.

Apesar de a nicotina interferir com mecanismos de memória, afetando assim a plasticidade neuronal (Abreu-Villaça et al. 2007, Gaddnas et al. 2001, Adriani et al. 2002), não há estudos que investiguem o potencial de inibidores da PDE em mitigar os efeitos desta droga de abuso. Da mesma forma, apesar do uso e abuso combinado de nicotina e etanol durante o desenvolvimento, pouco se sabe sobre o efeito da combinação entre estas drogas e como reduzir os dados decorrentes da exposição durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

1. OBJETIVOS

- Investigar em camundongos os efeitos na atividade locomotora e memória/aprendizado resultantes da exposição à nicotina e/ou ao etanol no período correspondente à gestação em humanos. Verificar alterações nos níveis de AMPc, GMPc, CREB total e CREB fosforilado no hipocampo e córtex cerebral nestes animais.

- Investigar os efeitos do tratamento com vimpocetina, um inibidor da fosfodiesterase, nas alterações na atividade, memória/aprendizado e níveis de AMPc, GMPc, CREB e CREB fosforilado de camundongos expostos à nicotina e/ou etanol.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta tese é de natureza experimental sendo integralmente desenvolvida no Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Todos os experimentos descritos aqui foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG/UERJ (CEUA/026/2012) e estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelo Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health - NIH*) dos Estados Unidos da América.

2.1. Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados 405 animais da cepa Suíço (221 machos e 184 fêmeas) oriundos de 46 ninhadas. Estes animais foram criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro num ciclo diário de 12 horas claro/escuro (escuro a partir das 14 horas), temperatura controlada e mantida em torno de 21° C, com livre acesso à água e comida.

2.2. Exposição as drogas

Machos e fêmeas da cepa Suíço foram postos para acasalar na proporção 2:1. A partir deste momento, os animais eram expostos à nicotina *free base* (50µg/ml) dissolvida em sacarina a 2% ou somente sacarina a 2% foram administradas na garrafa de água (figura 4).

A exposição à nicotina (50µg/ml) ocorreu desde o início da gestação e, após o nascimento dos filhotes, até o 8º dia de vida pós-natal. Desta forma, durante a gestação, a exposição dos filhotes ocorreu via placenta enquanto que após o nascimento, a exposição ocorreu via leite materno. Após o nascimento, etanol (5g/kg) ou salina foram injetados (i.p) diretamente nos filhotes, de cada ninhada, em dias alternados do 2º ao 8º dia de vida- pós-natal (PN2-PN8)

(Figura 4) . Do ponto de vista da maturação do sistema nervoso, é bem aceito que, para camundongos, os primeiros dez dias do desenvolvimento pós-natal correspondem ao último trimestre da gestação humana (Bandeira e col., 2009; Dobbing e Sands, 1979), um período onde ocorrem eventos como proliferação de neurônios, apoptose, formação e rearranjo sináptico em diversas regiões (Altman e Bayer 1990, Bayer 1983, Bayer et al. 1982, Huttenlocher 1990, McWilliams e Lynch 1983, Spear 2000) além de ser crítico para a manifestação da hiperatividade locomotora decorrente da exposição precoce ao etanol (Nunes e col., 2011).

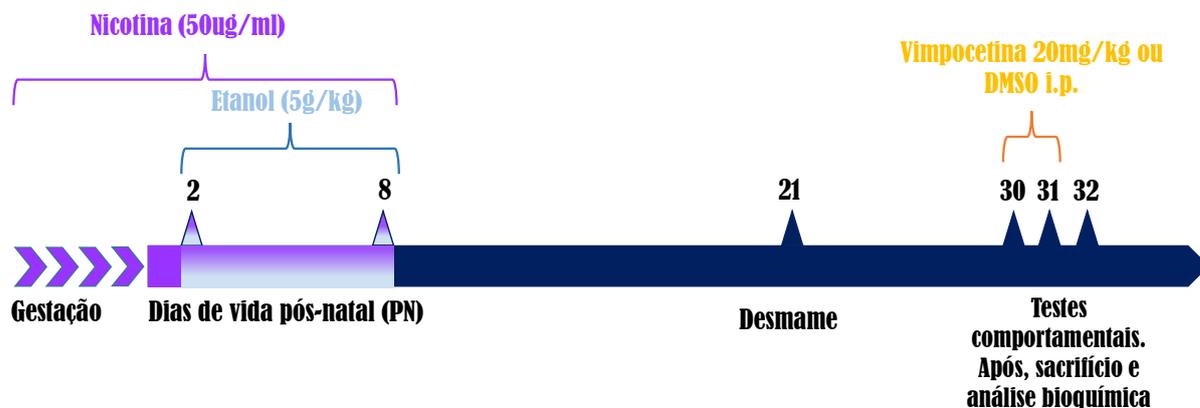
Fumantes regulares fumam durante o dia e interrompem o consumo durante o sono. Devido a isso, os animais tiveram livre acesso à nicotina, resultando em consumo durante seu período de atividade. Em relação ao etanol, escolhemos uma dose moderada a ser administrada nos filhotes em dias alternados, visando nos aproximarmos de um padrão intermitente de exposição da mãe.

No primeiro dia pós-natal (PN1), certificamo-nos de que em cada ninhada havia um número de filhotes entre oito e doze. Caso houvesse um número superior a doze ou menor que oito filhotes, estas ninhadas não eram utilizadas. Os animais foram pesados em dias alternados durante o período de exposição neonatal às drogas e no dia dos testes. Em relação a ingestão de líquido das mães, esta foi quantificada diariamente do 1º dia de vida ao 8º dia de vida pós natal dos filhotes.

Ao completarem 21 dias de vida pós-natal (PN21), os animais eram desmamados e agrupados por sexo em um máximo de cinco animais por gaiola e a progenitora era sacrificada. Como detalhado abaixo, em PN30, machos e fêmeas de cada ninhada recebiam uma injeção (i.p.) de vimpocetina 20mg/kg diluída em DMSO (dimetilsulfóxido) ou somente DMSO e, em seguida, cada animal era submetido a um teste comportamental (Figura 4).

A dose de etanol foi escolhida baseada em estudo anterior (Nunes et al., 2011; Filgueiras *et al.*, 2009) que utilizou a mesma dose e gerou níveis de etanol em soro semelhantes aqueles encontrados em fetos humanos após a ingestão materna de doses moderadas a altas de etanol. (Eckardt *et al.*, 1998). De forma semelhante, a dose de nicotina foi usada em diversos trabalhos realizados por nosso grupo, os quais demonstraram que a dose é bem tolerada (Ribeiro-Carvalho A et al, 2011; Oliveira-da-Silva A et al, 2009; Ribeiro-Carvalho A et al, 2008; Abreu-Villaça Y et al, 2008; Abreu-Villaça Y et al, 2007). O tratamento em dias alternados foi realizado a fim de reproduzir o consumo intermitente de etanol em humanos (Maier e West, 2001). As doses de vimpocetina foram baseados em estudo prévio (Nunes et al., 2011; Filgueiras *et al.*, 2010).

Figura 4. Linha Temporal.



Legenda: DMSO: Dimetilsulfóxido.

Fonte: A autora, 2017.

2.3. Formação dos grupos experimentais

Para o estudo completo do impacto da exposição à nicotina e/ou ao etanol bem como para o estudo completo do impacto do tratamento com vimocetina na reversão de alterações na atividade de camundongos expostos à estas drogas, foram necessários a formação e análise de oito grupos experimentais:

1. **NIC+ETOH_{VP20}** (nicotina oral + etanol i.p + vimocetina i.p). Mães expostas à nicotina com livre acesso em água de beber na concentração de 50mg/ml diluída em sacarina a 2%, e cujos filhotes receberam uma injeção de álcool absoluto na concentração de 5g/kg em dias alternados. No dia do teste comportamental em PN30, os animais receberam injeção de Vimocetina, 20mg/Kg, diluída em DMSO.
2. **NIC+ETOH_{DMSO}** (nicotina oral + etanol i.p + dmsou i.p). Mães expostas a nicotina cujos filhotes receberam etanol i.p. No dia do teste comportamental em PN30, os animais receberam injeção de DMSO.
3. **NIC_{VP20}** (nicotina oral + salina i.p + vimocetina i.p). Mães expostas à nicotina com livre acesso em água de beber na concentração de 50mg/ml diluída em sacarina a 2%, e cujos filhotes receberam salina ao invés de injeção de álcool absoluto. No dia do teste comportamental, os animais receberam injeção de DMSO.
4. **NIC_{DMSO}** (nicotina oral + salina i.p+ dmsou i.p). Mães expostas a nicotina cujos filhotes

receberam salina i.p. No dia do teste comportamental, os animais receberam injeção de Vimpocetina, 20mg/Kg, diluída em DMSO.

5. **ETOH_{VP20}** (sacarina a 2% oral + etanol i.p + vimpocetina i.p). Mães que receberam sacarina a 2% ao invés de nicotina em água de beber e cujos filhotes receberam uma injeção de álcool absoluto na concentração de 5g/kg em dias alternados. No dia do teste comportamental, os animais receberam injeção de Vimpocetina, 20mg/Kg, diluída em DMSO.
6. **ETOH_{DMSO}** (sacarina a 2% oral + etanol i.p + dmsol i.p). Mães que receberam sacarina na água de beber e cujos filhotes receberam etanol i.p. No dia do teste comportamental, os animais receberam injeção de DMSO.
7. **CONT_{VP20}** (sacarina a 2% oral + salina i.p + vimpocetina i.p). Mães que receberam sacarina na água de beber e cujos filhotes receberam salina i.p. No dia do teste comportamental, os animais receberam injeção de Vimpocetina, 20mg/Kg, diluída em DMSO.
8. **CONT_{DMSO}** (sacarina a 2% oral + salina i.p + dmsol i.p). Mães que receberam sacarina na água de beber e cujos filhotes receberam salina i.p. No dia do teste comportamental, os animais receberam injeção de DMSO.

2.4. Testes comportamentais

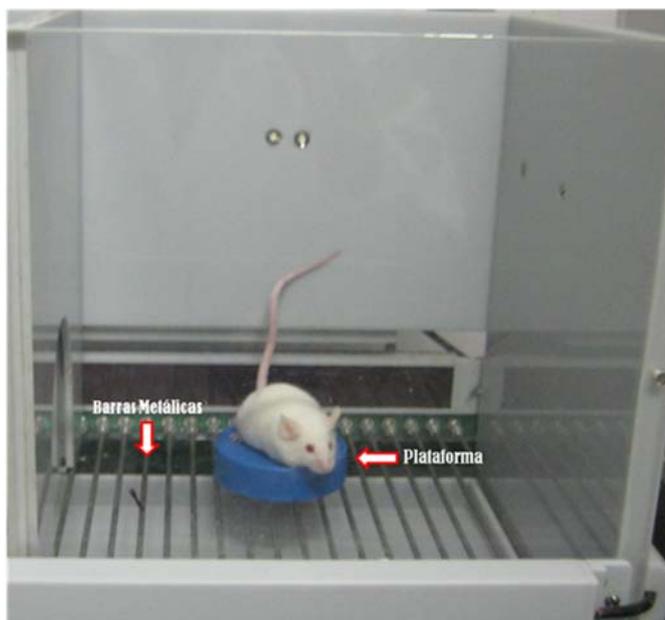
Os animais foram submetidos a análise comportamental de PN30 a PN32 a depender do teste utilizado. A fim de diminuir situações de estresse que pudessem interferir no resultado do experimento, o horário para a realização do teste comportamental, bem como o local de realização destes foram constantes e os animais eram ambientados na sala de testes por dez minutos antes de iniciada a análise comportamental.

2.4.1. Esquiva Passiva

Para identificar possíveis efeitos da nicotina, etanol e da dupla exposição na memória e aprendizado, os animais foram submetidos ao Teste de Esquiva Passiva (Figura 5). O mesmo foi realizado no 30º e 31º dias de vida pós-natal (PN30 e PN31, respectivamente), em uma caixa (25cm x 25cm) com uma plataforma circular com diâmetro de 6,5cm e altura de 1,7cm, posicionada centralmente sobre uma grade metálica com espaçamento igual entre as barras. Os animais foram submetidos a três sessões experimentais: 0 horas (T0), 6 horas depois da primeira sessão (T6) e 24 horas depois da primeira sessão (T24). Visando verificar o efeito da vimpocetina, uma hora antes da primeira sessão de teste, T0, os animais receberam uma injeção de vimpocetina (20mg/kg, i.p.) ou DMSO.

No primeiro dia de teste, durante T0, os animais foram individualmente colocados sobre a plataforma e esperou-se até três minutos para que descessem. Ao descer, imediatamente após colocarem as quatro patas na grade metálica, recebiam um choque de 0,3 mA durante 3 segundos. Seis horas (T6) e vinte quatro horas (T24) após a primeira sessão, os animais foram testados novamente, porém, sem administração de choque. Os testes T0 e T24 foram realizados entre 8:00h e 8:30h, enquanto que T6 foi realizado entre 14:00h e 14:30h. O tempo que os animais levavam para descer da plataforma (latência) foi anotado durante as três sessões experimentais (L0, L6 e L24). Após o término de cada teste, a caixa era limpa com o intuito de eliminar excretas e minimizar odores que pudessem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados.

Figura 5. Teste da Esquiva Passiva.



Legenda: O animal é colocado sobre a plataforma e espera-se até três minutos para que ele desça. Ao descer é administrado um choque através das barras metálicas.

Fonte: Imagem retirada do acervo de fotos dos equipamentos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)..

2.4.2. Campo Aberto

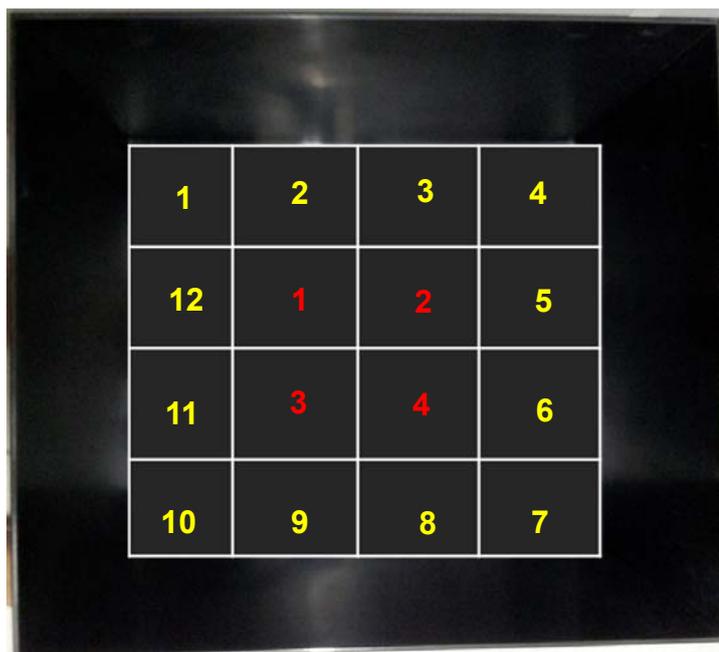
Para identificar possíveis efeitos da exposição às drogas de abuso na atividade locomotora, os animais foram submetidos ao Teste do Campo Aberto (Figura 6). O teste foi realizado no 30º dia de vida pós-natal (PN30) em uma caixa retangular de polipropileno (37,6 x 30,4 x 17 cm) que se apresenta dividida em 16 retângulos (9,4 cm x 7,6 cm), sendo 12 periféricos e 4 centrais. Visando verificar o efeito da vimpocetina, quatro horas antes do teste, os animais receberam uma injeção de vimpocetina (20mg/kg, i.p.) ou DMSO.

Ao iniciá-lo os animais eram colocados no centro da caixa e observada a atividade locomotora dos animais por 10 minutos. Após o término de cada teste, a caixa era limpa com o intuito de eliminar excretas e minimizar odores que pudessem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados. Os testes foram realizados entre 14:00h e 15:30h gravados para análise posterior.

A partir das imagens gravadas, a ambulação foi quantificada com base no número de retângulos cruzados pelo animal ao longo do teste bem como o tempo que permaneceram nos retângulos. Um retângulo foi considerado como cruzado toda vez que o animal colocava as quatro patas no retângulo. Utilizamos o programa ACC OpF HB Avaliação Computadorizada

de Comportamento (desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia/DCF/IBRAG/UERJ) para avaliação comportamental do teste de campo aberto. Foram quantificadas e avaliadas o tempo de ambulação no centro e ambulação total (C+P) que representa as entradas em cada retângulo do centro (C) e da periferia (P).

Figura 6. Teste do Campo Aberto.



Legenda: O animal é colocado no centro da arena e grava-se durante 10 minutos a sua ambulação. São analisadas as entradas nos quadrados da periferia e centro, assim como o tempo em que o animal permanece no centro e na periferia.

Fonte: Imagem retirada do acervo de fotos dos equipamentos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)..

2.4.3. Reconhecimento de Objetos

Para identificar possíveis efeitos da nicotina, etanol e da dupla exposição na memória e aprendizado, os animais foram submetidos ao Teste do Reconhecimento de Objetos (Figura 7). O teste foi realizado no 30º, 31º e 32º dias de vida pós-natal (PN30, PN31 e PN32) entre 10h e 12h. Para a realização das etapas descritas abaixo, os animais eram colocados no centro de uma arena retangular de polipropileno (37,6 x 30,4 x 17 cm) pintada de preto. O teste foi realizado em 4 etapas:

1. Habituação:

Realizada no 30º dia de vida pós-natal (PN30). Nesta primeira etapa, foi permitido a cada animal explorar o ambiente por 5 minutos sem a presença de nenhum objeto.

2. Treino:

Na sessão de treino foram utilizados 2 objetos idênticos: A1 e A2. Em PN31, 24 horas após a habituação, a sessão treino foi iniciada permitindo que o animal explorasse a arena por 5 minutos na presença destes 2 objetos, A1 e A2.

3. Sessão 1:

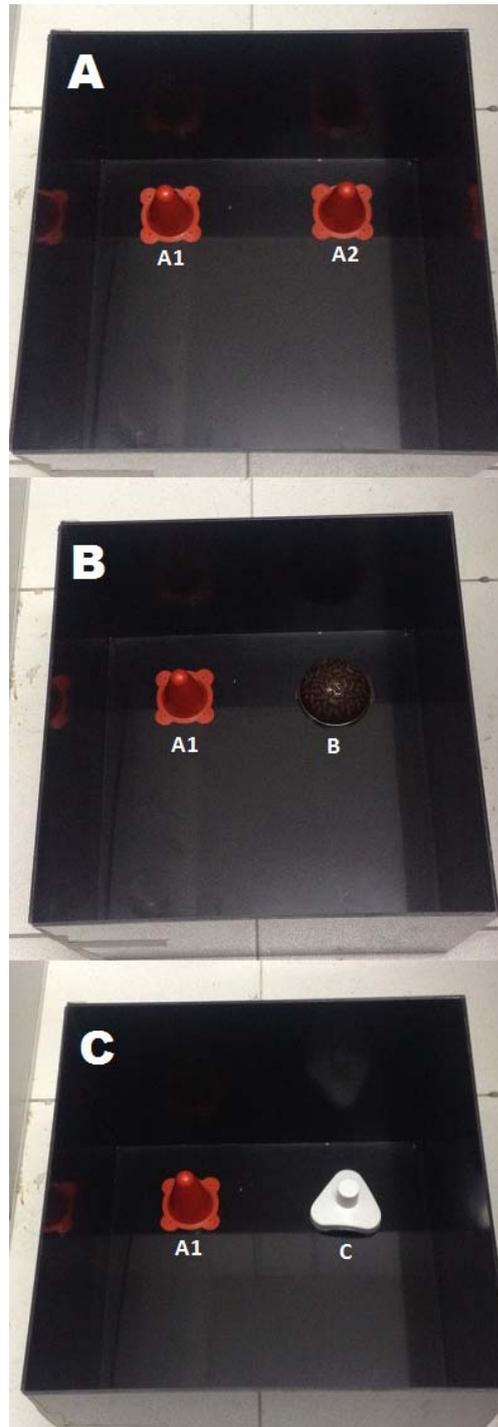
Duas horas antes dessa primeira sessão, visando verificar o efeito da vimpocetina, os animais receberam uma injeção de vimpocetina (20mg/kg, i.p.) ou DMSO. O teste para avaliação da memória de curto prazo foi realizado 1:30h depois da sessão treino por 5 minutos. Neste teste foi mantido o objeto A1, mas o objeto A2 foi substituído por outro, com características distintas, denominado B.

4. Sessão 2:

5. O teste para avaliação da memória de longa duração foi realizado 24 horas após a sessão treino, em PN32, onde o animal foi testado novamente 5 minutos. Neste teste foi mantido o objeto A1, mas o objeto B foi substituído por outro, com características distintas dos objetos A1, A2 e B, denominado objeto C.

Nas sessões 1 e 2, o tempo total gasto pelos animais interagindo com o objeto novo (B ou C) em relação ao objeto conhecido (A1) foi utilizado como medida de memória e aprendizado. Adicionalmente, o tempo total de interação com os objetos (objeto1+objeto2) foi quantificado no treino e nas sessões 1 e 2 com o objetivo de verificar se a exposição a nicotina e/ou etanol e se o tratamento com vimpocetina interferem na atividade exploratória. A interação com o objeto foi considerada nos momentos em que o animal cheirava ou tocava o objeto com o focinho ou as patas dianteiras.

Figura 7. Teste do Reconhecimento de Objetos.

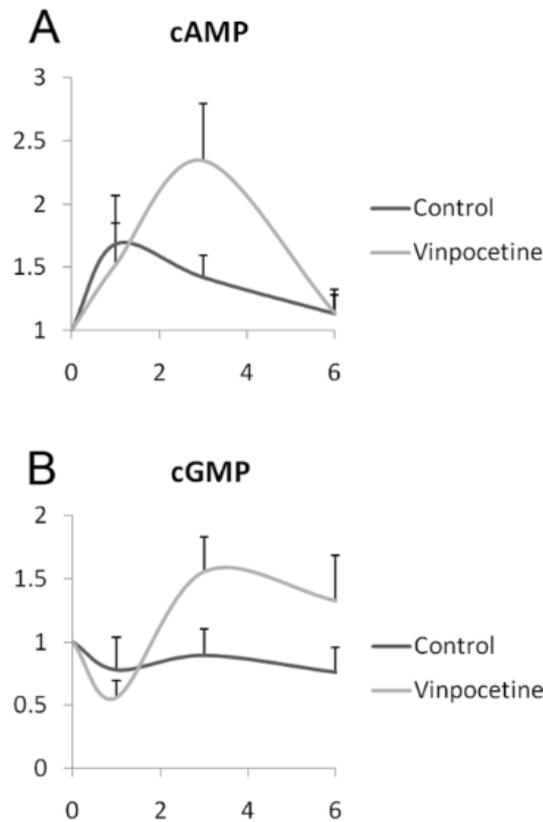


Legenda: O animal é colocado no centro da arena e sua movimentação gravada para posterior análise. A. Treino com dois objetos iguais A1 e A2. B. Sessão 1 realizada com a troca de um dos objetos, sendo B o objeto novo. C. Sessão 2 realizada novamente com a troca um dos objetos, no caso, C foi o objeto novo.
Fonte: Imagem retirada do acervo de fotos dos equipamentos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)..

2.5 Administração da Vimpocetina

Em relação a escolha do intervalo entre a administração da vimpocetina e a realização dos testes comportamentais: uma hora antes do T0 da Esquiva Passiva; 4 horas antes da sessão 1 do teste do Reconhecimento de Objetos e 4 horas antes do teste do Campo Aberto; usamos como referência dados não publicados - Dr. Alexandre Medina, University of Maryland, USA (Figura 8). Esses dados apresentados abaixo demonstram a concentração de AMPc e GMPc no córtex de furões após a administração de vimpocetina. Com eles podemos observar que a administração de vimpocetina provoca aumento na concentração de AMPc e GMPc a partir de uma hora após a sua administração, sendo seu pico em torno de 3 horas após essa administração. Adicionalmente, estudo realizado por nosso grupo, demonstrou que o tratamento agudo de vimpocetina (20mg/kg) quatro horas antes do teste do campo aberto foi capaz de restaurar a atividade locomotora afetada pela exposição precoce ao etanol (Nunes F et al, 2011).

Figura 8. Dados não publicados - Dr. Alexandre Medina, University of Maryland, USA.



Legenda: **A.** Concentração de AMPc após administração de vimpocetina, horas após essa administração.

B. Concentração de GMPc após administração de vimpocetina, horas após essa administração.

Fonte: Dados não publicados - Dr. Alexandre Medina, University of Maryland, USA.

2.6 Sacrifício e dissecação das regiões encefálicas

Após os testes, os animais eram sacrificados através de deslocamento cervical e as regiões encefálicas dissecadas seguindo os mesmos procedimentos descritos em outros estudos (Trauth et al., 2000). A técnica para o deslocamento se resume em segurar a cauda do animal com uma das mãos e com a outra apoiar uma pinça de dissecação, ou objeto similar, transversalmente sobre sua região cervical (pescoço). A seguir, pressiona-se firmemente a pinça para baixo e para frente, empurrando a cabeça do animal, enquanto, simultaneamente, traciona-se a cauda em sentido oposto para trás. Um espaçamento de 2 mm a 4 mm entre o côndilo occipital e a primeira vértebra cervical torna-se palpável após o descolamento. Ainda podemos

observar alguma atividade muscular, por alguns segundos, mas trata-se apenas de movimentos reflexos, pois a perda total de sensação dolorosa e a morte são imediatas.

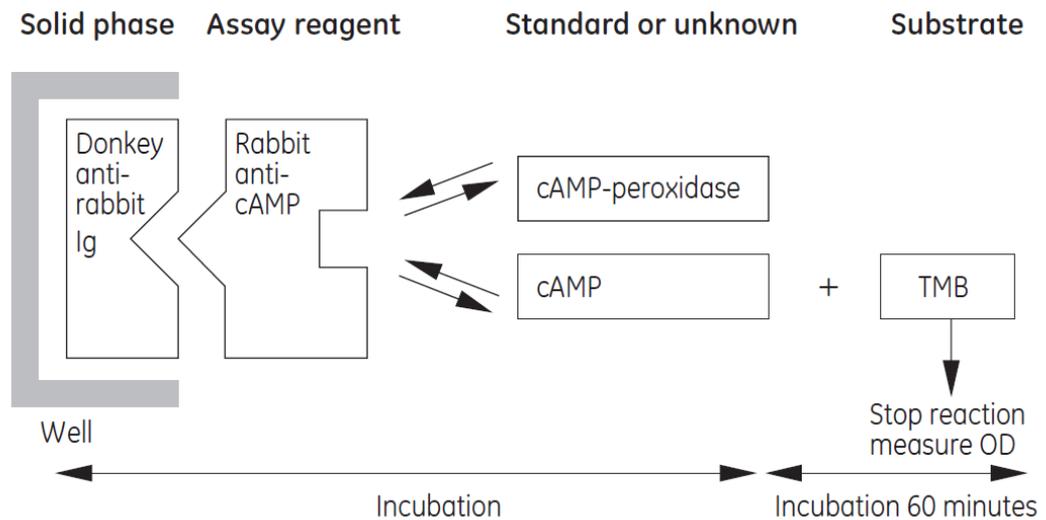
Em relação a dissecação, inicialmente incisões foram feitas através dos pedúnculos cerebelares para isolar o cerebelo. O córtex cerebral (prosencefalo com remoção do hipocampo, mas mantendo o corpo estriado) foi separado do tronco cerebral por um corte feito rostral ao tálamo. Após a dissecação do tecido, o córtex cerebral esquerdo e direito e o hipocampo foram congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior quantificação do AMPc e do GMPc e análise da expressão de proteínas CREB e pCREB descritas abaixo. A escolha das regiões, córtex e hipocampo, foi devido ao fato das mesmas estarem intimamente envolvidas com os processos de memória/aprendizado e atividade locomotora.

2.7 Quantificação do AMPc

A quantificação do AMPc, foi realizada através de um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, combinando o uso de um conjugado de AMPc marcado com peroxidase, um antisoro que pode ser imobilizado sobre microplacas pré-revestidas, e uma solução de substrato estabilizado.

O ensaio é baseado na competição entre AMPc não marcado e uma quantidade fixa de AMPc marcado com peroxidase por um número limitado de sítios de ligação aos anticorpos específicos anti-AMPC (figura 9).

Figura 9. Ensaio Imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak para quantificação de AMPc.



Fonte: Manual do Ensaio Imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak para quantificação de AMPc.

Este Kit possui dois protocolos. Neste trabalho, utilizamos o Protocolo de Não Acetilação.

2.7.1 Preparação do tecido

As análises foram realizadas com o tecido cerebral dos animais submetidos ao teste do campo aberto, os quais foram sacrificados imediatamente após a realização da sessão do teste. Os cérebros foram dissecados sendo os hipocampus e o córtex direito separados e congelados rapidamente por imersão em nitrogênio líquido, para evitar alterações no AMPc das amostras, e, então, guardados a -80°C para a posterior análise.

No dia das análises, os tecidos foram descongelados e foi acrescentado a cada amostra 500ul de tampão Tris HCl 0,1M a 4°C + 1nM de EDTA + 1mM de inibidor PDE iBMx. Após, as amostras foram homogeneizadas no “Precellys” (BERTIN TECHNOLOGIES, França) (Figura 10) à 5500 rpm. Ao homogeneizado desse preparado foram adicionados 955ul de etanol a 4°C à suspensão dando um volume final de 65% de etanol. Após, as amostras foram centrifugadas em 4°C por 2 minutos a 1000xg. O sobrenadante retirado foi colocado em banho seco à 80°C . As alíquotas de tecido deste preparado foram ressuspensas em 500ul de tampão

de ensaio do kit, quando as amostras eram de hipocampo e ressuspendidas em 1000ul do tampão quando as amostras eram de córtex a guardadas para posterior quantificação.

Figura 10. Equipamento “Precellys (BERTIN TECHNOLOGIES, França).



Nota: É colocado nitrogênio líquido no recipiente adequado sendo o mesmo transferido para o local onde as amostras estão inseridas. Isto permite que a temperatura se encontre no valor desejado, preservando as características da amostra.

Fonte: Imagem retirada do acervo de fotos dos equipamentos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

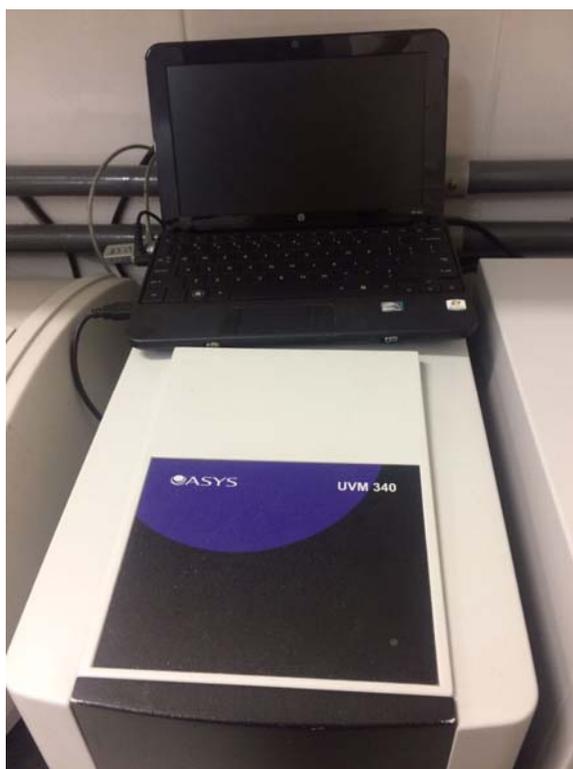
Antes da preparação da curva de calibração, as amostras foram diluídas na proporção de 1:5 quando o tecido era o hipocampo e 1:2,5 quando era córtex. Após, foi feita a curva de calibração que consiste em nove pontos (6400, 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 e 25 fmol) preparados a partir da solução padrão de ensaio de não acetilação presente no kit, a qual consiste em uma solução padrão de cAMP liofilizada, contendo 64 pmol AMPc/ml. A solução padrão foi diluída com tampão de ensaio também presente no kit.

2.7.2 Preparação da placa

Finalizada a preparação da curva, iniciávamos a preparação da placa colocando 200ul de tampão de ensaio (0.05M de Tampão de acetato do sódio, pH 6.0 que contém 0.002%(w/v)

de Albumina de Soro de Bovino e 0,01%(m/v) de conservantes) no poço NSB (Non-Specific Binding=ligação não específica) e 100ul no poço zero. Seguindo, colocávamos 100ul de cada ponto da curva e 100ul das amostras nos poços, em duplicata. Adicionávamos em todos os poços, menos no NSB, a solução de anticorpo anti-AMPc e incubávamos por 2 horas em gelo. Após, eram acrescentados 50ul de AMPc conjugado e incubávamos novamente por 1 hora em gelo. Ao final, as soluções presentes em todos os poços eram descartadas e feitas sucessivas lavagens com tampão de lavagem e acrescentados 150ul de TMB em todos os poços agitando por 1 hora em temperatura ambiente. Cor azul irá surgir devendo ser lido em leitor de elisa (Biochrom Asys modelo UVM340, Estados Unidos) (Figura 11) à 630nm. Após essa primeira leitura, para interromper a reação, adicionávamos 100ul de ácido sulfúrico a 1M em cada poço e fazíamos a leitura novamente à 450 nm 25 minutos após.

Figura 11. Equipamento Leitor de Elisa (Biochrom Asys modelo UVM340, Estados Unidos).

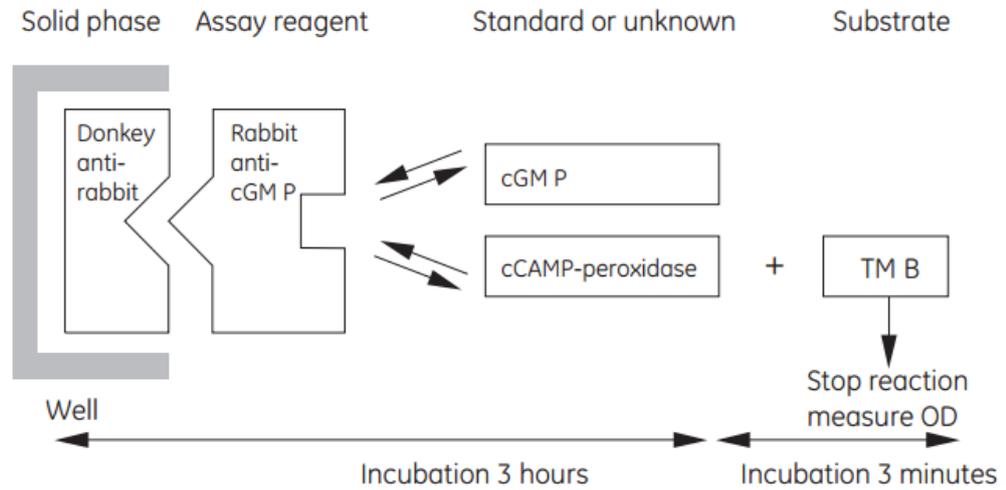


Fonte: Imagem retirada do acervo de fotos dos equipamentos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

2.8 Quantificação do GMPc

Os ensaios foram realizados por um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, explicado acima (Figura 12).

Figura 12. Ensaio Imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak de GMPC.



Fonte: Fonte: Manual do Ensaio Imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak para quantificação de GMPC.

Assim como no ensaio do AMPc, este Kit também possui dois protocolos para realização da quantificação sendo que, neste trabalho, utilizamos o Protocolo de Acetilação.

2.8.1 Preparação do tecido

Os tecidos utilizados foram os mesmos usados para quantificação de AMPc, sendo assim, a preparação foi a mesma para ambos os ensaios.

2.8.2 Preparação da placa

Após a ressuspensão com tampão de ensaio as amostras foram descongeladas para serem usadas. Antes da preparação da curva de calibração, as amostras foram diluídas na concentração de 1:2,5 (diluídas duas vezes e meia) quando o tecido usado era córtex e não foram diluídas quando usamos o hipocampo. Após, foi feita a curva que consiste em nove pontos (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 fmol) preparados a partir da solução padrão de ensaio de não acetilação presente no kit, a qual consiste em uma solução padrão de cAMP liofilizada, contendo 64 pmol AMPc/ml. A solução padrão foi diluída com tampão de ensaio também presente no kit.

Finalizada a preparação da curva, iniciávamos a preparação do reagente de acetilação, sendo acrescentado 15ul do mesmo em cada tubo que continha 150ul de amostra. Para preparação da placa, foram pipetados 150ul de tampão de ensaio (0.05M de Tampão de acetato do sódio, pH 6.0 que contém 0.002%(w/v) de Albumina de Soro de Bovino e 0,01%(m/v) de conservantes) mais 15ul de reagente de acetilação no ponto zero. Após todas as amostras e pontos das curvas estarem devidamente prontos contendo o reagente de acetilação, adicionamos em todos os poços, menos no NSB, a solução de anticorpo. Em seguida, eram pipetados 50ul dos pontos da curva e das amostras, em duplicata. Após, eram acrescentados 150ul de tampão de ensaio no poço NSB. Cobríamos a placa e a incubávamos por 2 horas no gelo. 100ul de GMPc conjugado eram adicionados aos poços e incubados por 1 hora no gelo. Ao final, as soluções presentes em todos os poços eram descartadas e feitas sucessivas lavagens com tampão de lavagem e acrescentados 200ul de TMB em todos os poços agitando por 30 minutos em temperatura ambiente. Cor azul irá surgir devendo ser lido em leitor de elisa (Figura 5) à 630nm. Após essa primeira leitura, para interromper a reação, adicionávamos 100ul de ácido sulfúrico a 1M em cada poço e fazíamos a leitura novamente à 450 nm de 5 em 5 minutos.

2.9 **Análise da expressão de proteínas – CREB e pCREB – por Western Blotting**

Avaliamos a expressão de CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca⁺⁺) e pCREB (proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca⁺⁺ fosforilada) no córtex esquerdo. Os tecidos foram homogeneizados em 1300µl

de tampão de lise (50 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, e 1% Triton X-100, pH 6.4). Foi adicionado ao tampão, coquetel de inibidores de protease (aprotinina 1mg/mL, leupeptina 1mg/mL e SBTI 1mg/mL) e ortovonadato. Em seguida, o homogenato foi centrifugado (13.000 rpm/25 min) a 4° C.

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

Tabela 5: Anticorpos específicos

	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
CREB	anti-CREB, mouse (Sigma, 1:1.000)	anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, 1:10.000)
pCREB	anti-pCREB, rabbit (Sigma, 1:1.000)	anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, 1:10.000)
ACTINA	anti-actina, mouse (Santa Cruz Biotechnology, 1:500)	anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, 1:5.000)

Legenda: CREB: Proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca⁺⁺. pCREB: Proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca⁺⁺ fosforilada.

Fonte: Lotufo, B M, 2016.

2.10 Análise estatística

Os dados foram compilados como médias e erros padrões. O valor de significância assumido foi de $p \leq 0,05$.

2.10.1 Análise da massa corporal e ingestão de líquido

Foram realizadas e Análises de Variância com medidas repetidas (ANOVA_r) para as variáveis: massa corporal dos animais neonatos e ingestão de líquido pelas mães lactantes. O DIA da medição foi considerado fator de repetição. NIC (veh e nicotina) e ETOH (veh e etanol) foram considerados fatores. Diferenças entre grupos foram submetidas à análise post-hoc através do teste *Fisher's Protected Least Significant Difference* (FPLSD).

A análise da massa corporal nos dias de teste comportamental (PN30 ou PN31) foi realizada por ANOVAs com os fatores NIC, ETOH, TRATAMENTO e SEXO. Diferenças entre grupos foram submetidas à análise post-hoc pelo teste FPLSD.

Com o objetivo de minimizar a influência dos efeitos de ninhada, para as análises de massa corporal, consideramos a média dos valores dos machos e das fêmeas de uma mesma ninhada e não valores individuais.

2.10.2 Análise dos testes comportamentais

Foram realizadas ANOVAs com os fatores NIC (veh e nicotina), ETOH (veh e etanol), TRATAMENTO (DMSO e vimpocetina) e SEXO. Para o teste da esQUIVA passiva, as variáveis utilizadas para avaliar memória e aprendizado foram L0, L6 e L24. Para o teste do campo aberto, as variáveis avaliadas foram o escore de ambulação total (entradas no C+Pe) como indicador de atividade e o tempo no centro como indicador de ansiedade. Quanto ao teste do reconhecimento de objetos, para investigar se a exposição a nicotina e/ou etanol interferem na atividade exploratória, a variável estudada foi o tempo total de interação com os objetos na sessão treino e nas sessões 1 e 2 (A1+A2 para o treino, A1+B para a 1ª sessão e A1+ C para a 2ª sessão). Adicionalmente, nas sessões 1 e 2, o tempo total gasto pelos animais interagindo com o objeto novo (B ou C) em relação ao objeto conhecido (A1) foi utilizado como medida de memória e aprendizado (Sessão 1: $B/(A1+B)*100$; sessão 2: $C/(A1+C)*100$).

2.10.3 Análise da avaliação neuroquímica

Foram realizadas ANOVAs com os fatores NIC (veh e nicotina), ETOH (veh e etanol), TRATAMENTO (DMSO e vimpocetina) e SEXO. Para a avaliação neuroquímica, as variáveis avaliadas foram as concentrações de AMPc, GMPc, CREB e pCREB.

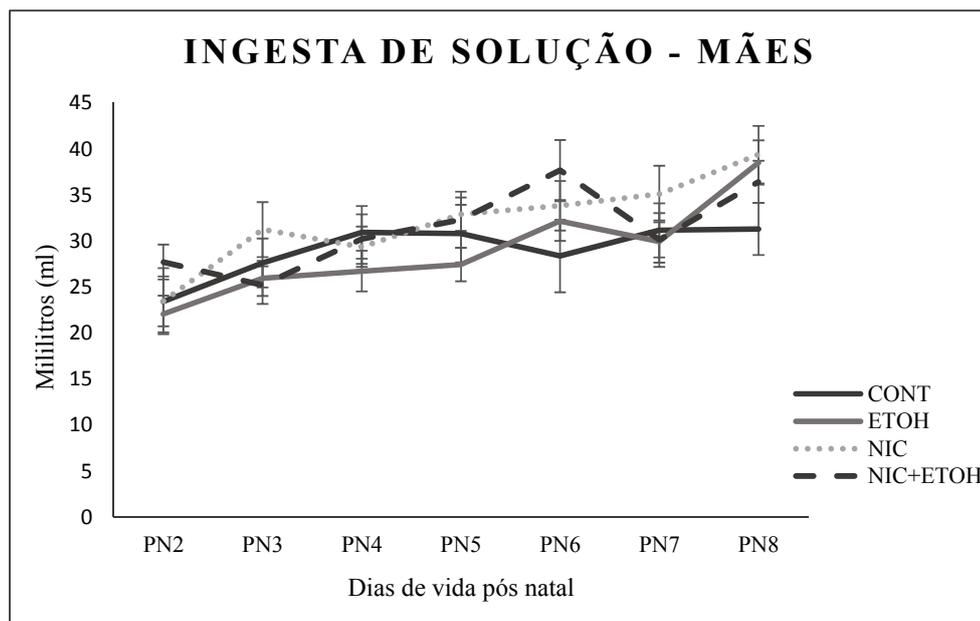
Para todos os testes comportamentais e para a análise neuroquímica, quando efeitos significativos de NIC, ETOH, TRATAMENTO ou interações entre estes fatores eram encontrados, eram realizadas comparações entre grupos pelas análises comparativas post-hoc FPLSD.

3 RESULTADOS

3.1 Ingestão líquida das mães durante a lactação

Houve um aumento na ingestão de líquido (DIA: $F_{6,270} = 11,38$; $p \leq 0,001$), ao longo do período da lactação pelas mães de todos os grupos experimentais (figura 13), porém não houve efeito da exposição as drogas.

Figura 13. Evolução do consumo de líquido das mães que receberam água+sacarina (CONT = 14 e ETOH = 14) ou nicotina+sacarina (NIC = 11 e NIC+ETOH = 10) como fonte de líquido durante a gestação e durante o período de lactação.



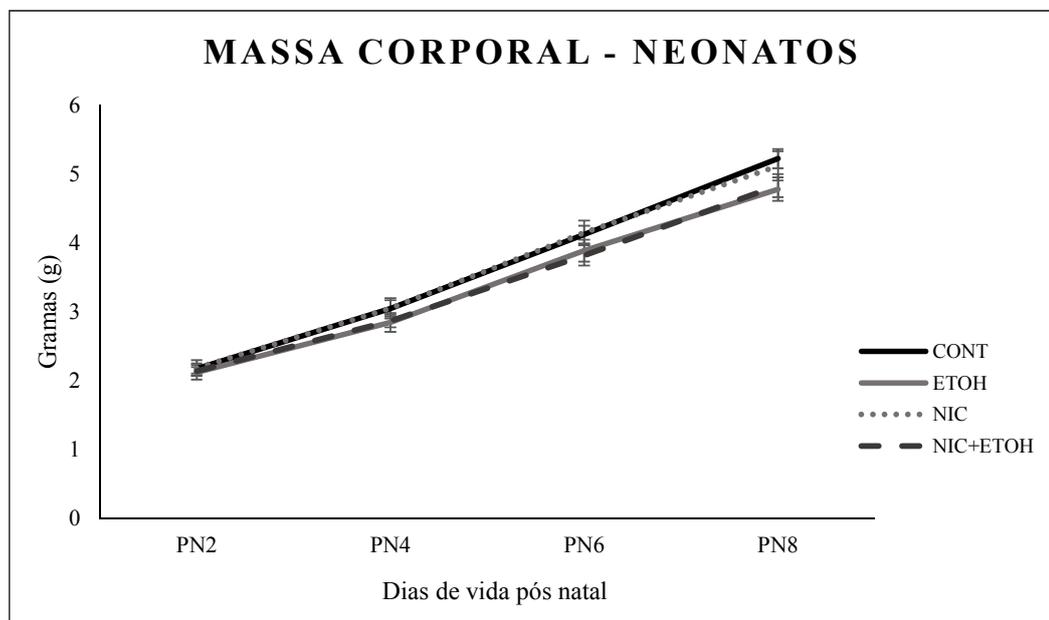
Legenda: A quantificação da ingestão de líquido ocorreu entre o segundo e o oitavo dia de vida pós natal (PN2 à PN8). Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2017.

3.2 Massa corporal dos neonatos

Houve um aumento na massa corporal (DIA: $F_{3,138} = 1565,6$; $p \leq 0,001$), ao longo do período de vida pós natal (PN2 a PN8) de todos os grupos experimentais (figura 14), porém não houve efeito da exposição as drogas.

Figura 14. Evolução da massa corporal dos neonatos que receberam injeção intraperitoneal de etanol na dose de 5g/kg, em dias alternados, durante a primeira semana de vida pós natal (PN2, PN4, PN6 e PN8) (ETOH = 15, NIC+ETOH = 10) ou que receberam salina (CONT = 15, NIC = 11), também através de injeções intraperitoneais.



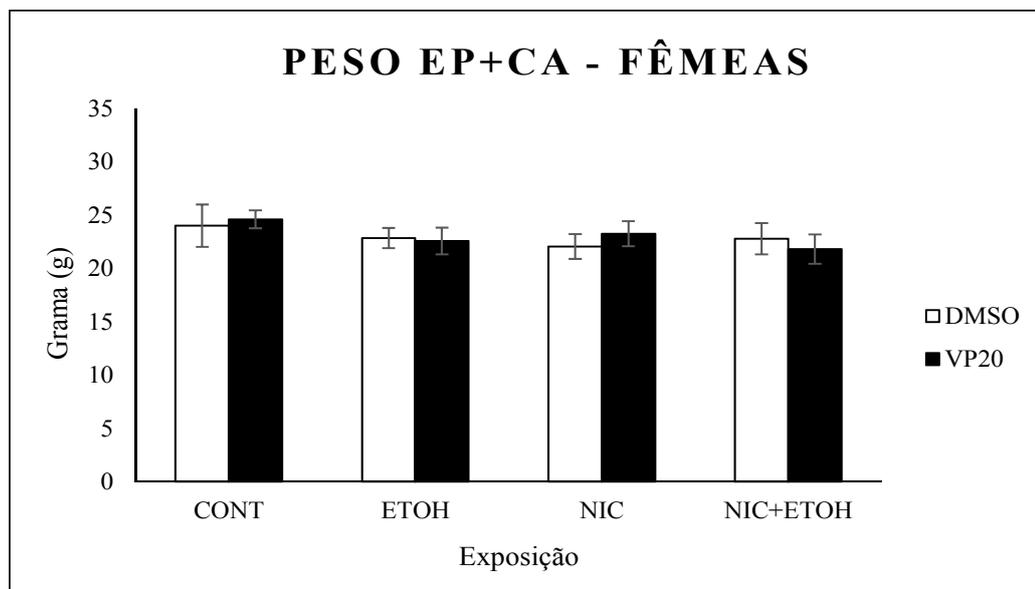
Legenda: Valores representam média \pm EPM. g, gramas.
Fonte: A autora, 2017.

3.3 Massa corporal dos animais adolescentes

A medida da massa corporal dos animais testados no campo aberto e na esquiua passiva foi realizada em PN30, contudo, os animais submetidos ao teste do reconhecimento de objetos foram pesados em PN31. Assim, foi realizada uma análise de massa corporal para a média dos animais de cada ninhada destinados ao campo aberto e esquiua passiva, e uma análise em separado para a média de massa corporal dos animais de cada ninhada submetidos ao teste do reconhecimento de objetos.

Quanto a massa corporal dos animais testados no campo aberto e esquiua passiva, identificamos um efeito do etanol quando administrado sozinho e uma interação entre nicotina e etanol (ETOH: $F_{1,124} = 4,19$; $p=0,043$; NIC*ETOH: $F_{1,124} = 4,22$; $p=0,042$). Porém, não encontramos efeitos ou interações com o tratamento, o que demonstra que os animais que receberam vimpocetina tinham massa corporal semelhante aqueles que receberam DMSO. Devido a não termos encontrados efeito do tratamento, fizemos uma nova análise agora, sem usar o tratamento como fator. Nessa, encontramos os mesmo efeitos acima, do etanol e interação nicotina e etanol, além da interação da nicotina com o sexo (ETOH: $F_{1,132} = 4,54$; $p=0,035$; NIC*ETOH: $F_{1,132} = 4,73$; $p=0,031$ e NIC*SEXO: $F_{1,132} = 4,40$; $p=0,038$). Estes resultados são explicados pelo fato dos animais que receberam etanol durante o período equivalente ao 3º trimestre da gestação em humanos, apresentarem uma diminuição da massa corporal no período da adolescência, quando comparados aos animais dos demais grupos, sendo esse efeito mostrado, de forma significativa, apenas nos machos (Machos: ETOH < CONT: $p=0,005$; ETOH < NIC: $p=0,015$; ETOH < NIC+ETOH: $p=0,019$) (Figuras 15 e 16).

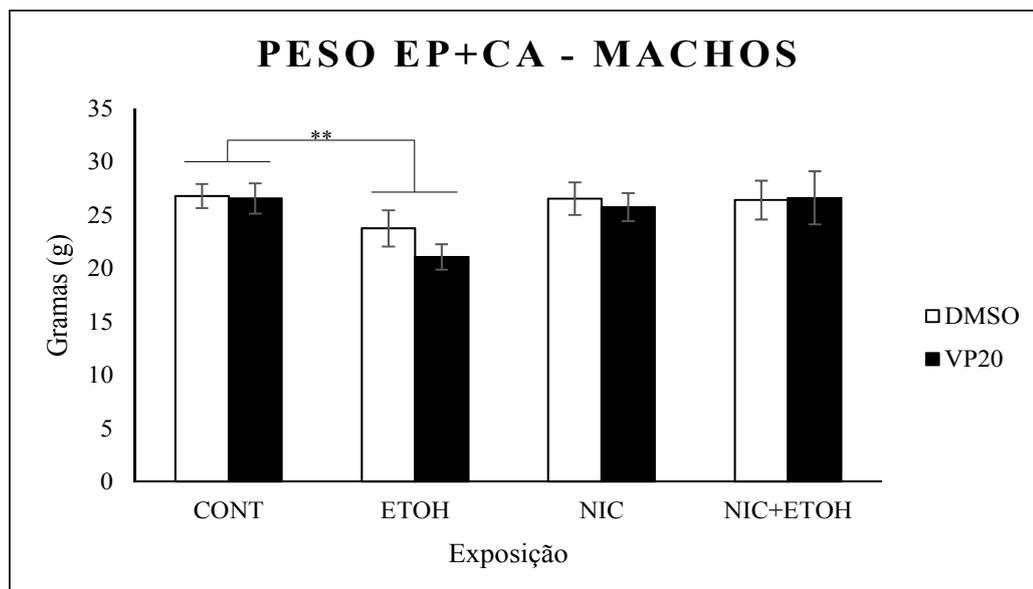
Figura 15. Massa corporal de fêmeas expostas a nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento pré e pós-natal recente e submetidas ao teste da Esquiva Passiva (EP) e Campo Aberto (CA), no 30o dia de via pós natal (PN30) quando foram separados por tratamento: vimpocetina na dose de 20mg/kg ou DMSO administrados através de uma única injeção intraperitoneal (i.p.).



Legenda: ($CONT_{DMSO} = 6$; $CONT_{VP20} = 14$; $ETOH_{DMSO} = 9$, $ETOH_{VP20} = 8$; $NIC_{DMSO} = 10$; $NIC_{VP20} = 9$; $NIC+ETOH_{DMSO} = 7$; $NIC+ETOH_{VP20} = 7$). Valores representam média \pm EPM. g, gramas.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 16. Massa corporal de machos expostos a nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento pré e pós-natal recente e submetidos ao teste da Esquiva Passiva (EP) e Campo Aberto (CA), no 30º dia de via pós natal (PN30) quando foram separados por tratamento: vimpocetina na dose de 20mg/kg ou DMSO administrados através de uma única injeção intraperitoneal (i.p.).



Legenda: (CONT_{DMSO}= 9; CONT_{VP20}= 12; ETOH_{DMSO}= 8, ETOH_{VP20}= 8; NIC_{DMSO}= 10; NIC_{VP20}= 11; NIC+ETOH_{DMSO}= 6; NIC+ETOH_{VP20} = 6). Valores representam média ±EPM. g, gramas. ** para p > 0,01.

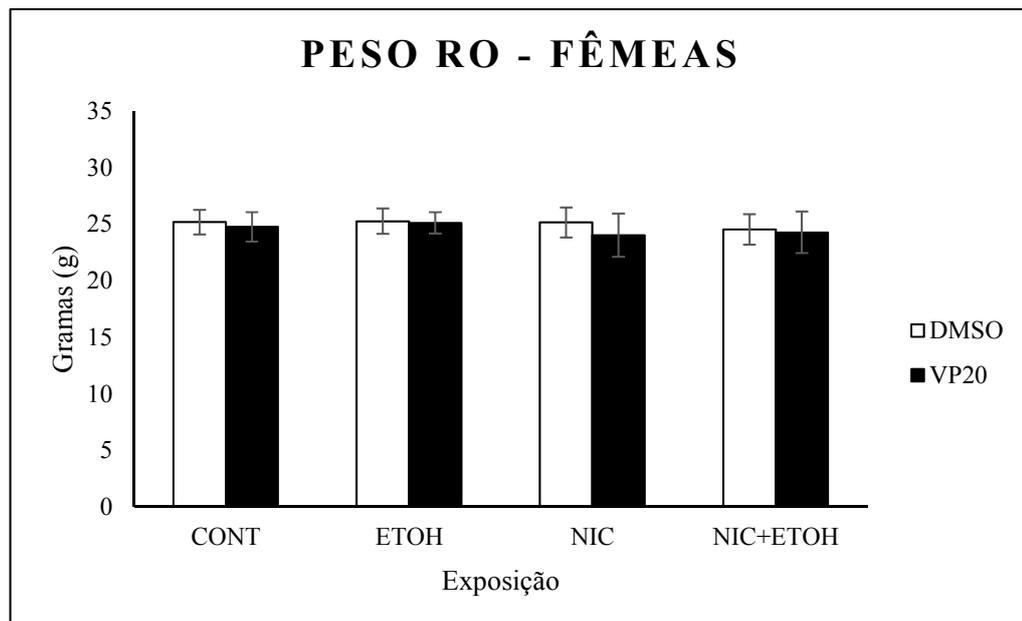
Fonte: A autora, 2017.

Como descrito acima, a massa corporal dos animais submetidos ao teste do reconhecimento de objetos foi analisada em separado uma vez que foi obtida um dia após os demais animais. Isto ocorreu porque, embora a 1ª sessão do teste ocorra em PN30 (sessão de habituação), a pesagem dos animais ocorre no dia seguinte, quando há a separação dos animais entre aqueles que irão ser tratados com vimpocetina ou DMSO.

A ANOVA inicial utilizando todos os fatores identificou um efeito do etanol, que variou em função do sexo dos animais (ETOH: $F_{1,93} = 4,01$; $p=0,048$; ETOH*Sexo: $F_{1,93} = 3,99$; $p=0,049$). Não encontramos efeitos ou interações com o tratamento, o que demonstra que os animais que receberam vimpocetina tinham massa corporal semelhante aqueles que receberam DMSO. Devido a não termos encontrados efeito do tratamento, fizemos uma nova análise agora, sem usar o tratamento como fator. Nessa, confirmamos os efeitos descritos acima (ETOH: $F_{1,101} = 3,99$; $p=0,049$ e ETOH*SEXO: $F_{1,101} = 4,12$; $p=0,045$). Camundongos machos adolescentes expostos precocemente ao etanol e expostos a combinação entre nicotina e etanol

apresentaram menor massa corporal aqueles não expostos a esta droga (ETOH < CONT: $p=0,01$; CONT < NIC+ETOH: $p=0,04$) (Figuras 17 e 18).

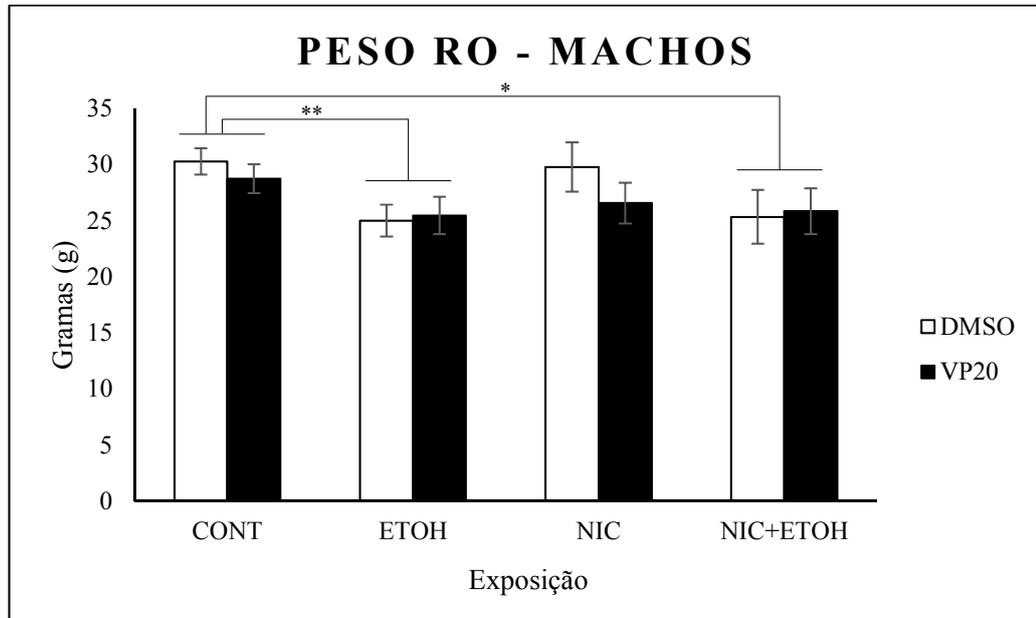
Figura 17. Massa corporal de fêmeas expostas a nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento pré e pós-natal recente e submetidas ao teste do Reconhecimento de Objetos (RO), no 31º dia de vida pós natal (PN31) quando foram separados por tratamento: vimpocetina na dose de 20mg/kg ou DMSO administrados através de uma única injeção intraperitoneal (i.p.)



Legenda: (CONT_{DMSO}= 6; CONT_{VP20}= 6; ETOH_{DMSO}= 6, ETOH_{VP20}= 5; NIC_{DMSO}= 8; NIC_{VP20}= 8
NIC+ETOH_{DMSO}= 5; NIC+ETOH_{VP20}= 4). Valores representam média ±EPM. g, gramas.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 18. Massa corporal de machos expostos a nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento pré e pós-natal recente e submetidos ao teste do Reconhecimento de Objetos (RO), no 31º dia de vida pós natal (PN31) quando foram separados por tratamento: vimpocetina na dose de 20mg/kg ou DMSO administrados através de uma única injeção intraperitoneal (i.p.).



Legenda: (CONT_{DMSO} = 7; CONT_{VP20} = 8; ETOH_{DMSO} = 9, ETOH_{VP20} = 8; NIC_{DMSO} = 8; NIC_{VP20} = 9; NIC+ETOH_{DMSO} = 6; NIC+ETOH_{VP20} = 6). Valores representam média ±EPM. g, gramas. * para p > 0,05 e ** para p > 0,01.

Fonte: A autora, 2017.

3.4 Testes Comportamentais

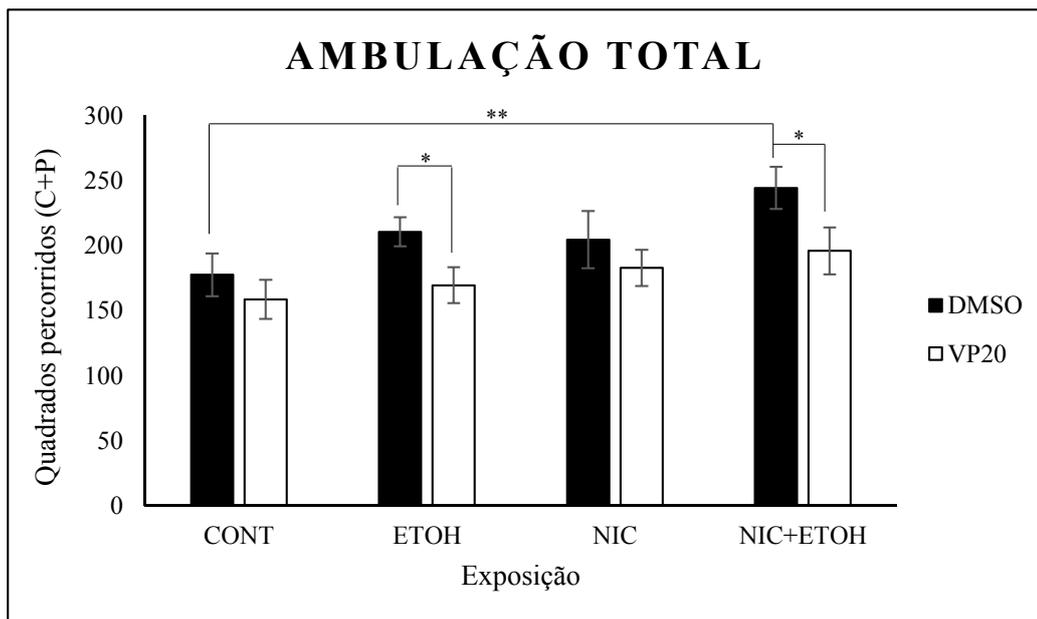
3.4.1 Campo Aberto

3.4.1.1 Ambulação Total

A análise estatística mostrou que os animais que receberam nicotina (NIC: $F_{1,119} = 5,48$; $p=0,02$) e etanol (ETOH: $F_{1,119} = 5,16$; $p=0,02$) durante o desenvolvimento, tiveram a sua atividade locomotora aumentada quando avaliados na adolescência. Adicionalmente, o tratamento agudo com vimpocetina foi capaz de reduzir o efeito de hiperatividade locomotora

desencadeado pela exposição as drogas (Tratamento: $F_{1,119} = 8,33$; $p=0,005$). A análise comparativa entre os grupos experimentais indicou que o aumento da atividade foi significativo somente no grupo NIC+ETOH ($CONT_{DMSO} < NIC+ETOH_{DMSO}$: $p=0,004$). Adicionalmente, neste grupo, o tratamento com vimpocetina foi capaz de reduzir a atividade ($NIC+ETOH_{DMSO} > NIC+ETOH_{VP20}$ $p=0,04$) até os níveis do controle ($NIC+ETOH_{VP20} = CONT_{DMSO}$, $p= 0,44$). O aumento da atividade não alcançou significância nos grupos expostos somente a nicotina ou etanol, contudo a vimpocetina reduziu a atividade nos animais ETOH ($ETOH_{DMSO} > ETOH_{VP20}$: $p=0,04$ e) (Figura 19).

Figura 19. Média da ambulação total em 10 minutos no teste do campo aberto dos animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que, 4 horas antes do teste, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO)



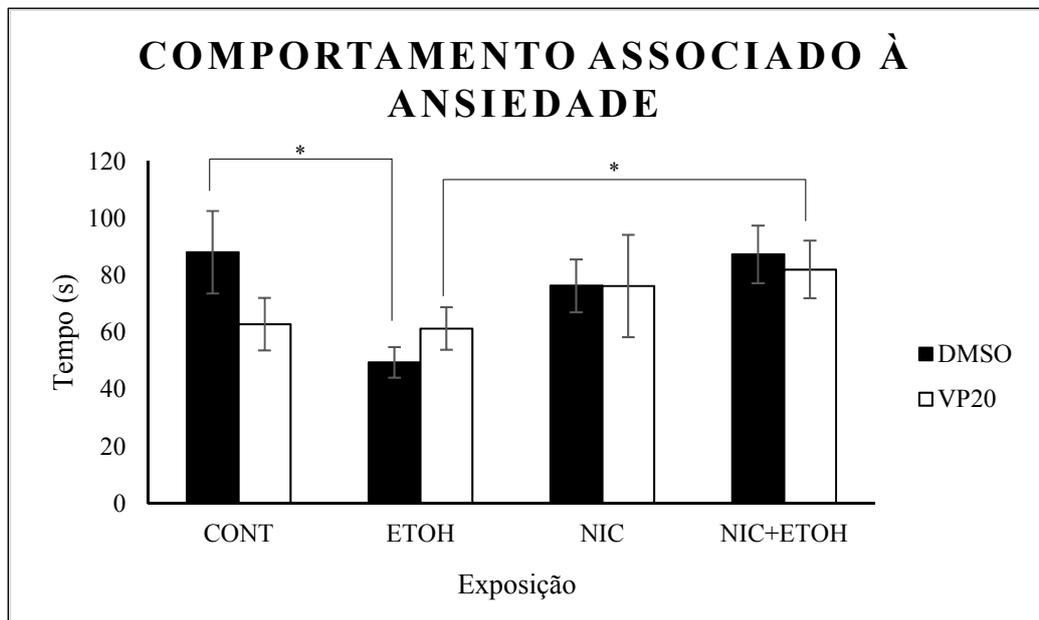
Legenda: ($CONT_{DMSO}= 16$; $CONT_{VP20}= 17$; $ETOH_{DMSO}= 19$, $ETOH_{VP20}= 21$; $NIC_{DMSO}= 16$; $NIC_{VP20}= 16$; $NIC+ETOH_{DMSO}= 16$; $NIC+ETOH_{VP20}= 14$). Valores representam média \pm EPM. * $p > 0,05$. ** $p > 0,01$.

Fonte: A autora, 2017.

3.4.1.2 Comportamento associado à ansiedade

Em relação ao tempo no centro da arena, observamos uma interação entre as duas drogas, nicotina e etanol (NIC*ETOH: $F_{1,118} = 4,24$; $p=0,04$). A análise *poshoc* demonstrou efeito ansiogênico do etanol ($CONT_{DMSO} > ETOH_{DMSO}$: $p=0,011$). Porém, esse efeito ansiogênico não é observado quando há a exposição somente a nicotina ($CONT_{DMSO} = NIC_{DMSO}$: $p=0,46$) ou exposição concomitante as duas drogas, nicotina e etanol ($CONT_{DMSO} = NIC+ETOH_{DMSO}$: $p=0,96$; $ETOH_{DMSO} < NIC+ETOH_{DMSO}$: $p=0,013$) (figura 20).

Figura 20. Média do tempo total no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto dos animais que foram expostos nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que, imediatamente antes do teste, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO).



Legenda: ($CONT_{DMSO} = 16$; $CONT_{VP20} = 17$; $ETOH_{DMSO} = 19$, $ETOH_{VP20} = 21$; $NIC_{DMSO} = 16$; $NIC_{VP20} = 16$; $NIC+ETOH_{DMSO} = 16$; $NIC+ETOH_{VP20} = 14$). Valores representam média \pm EPM. * $p > 0,05$.

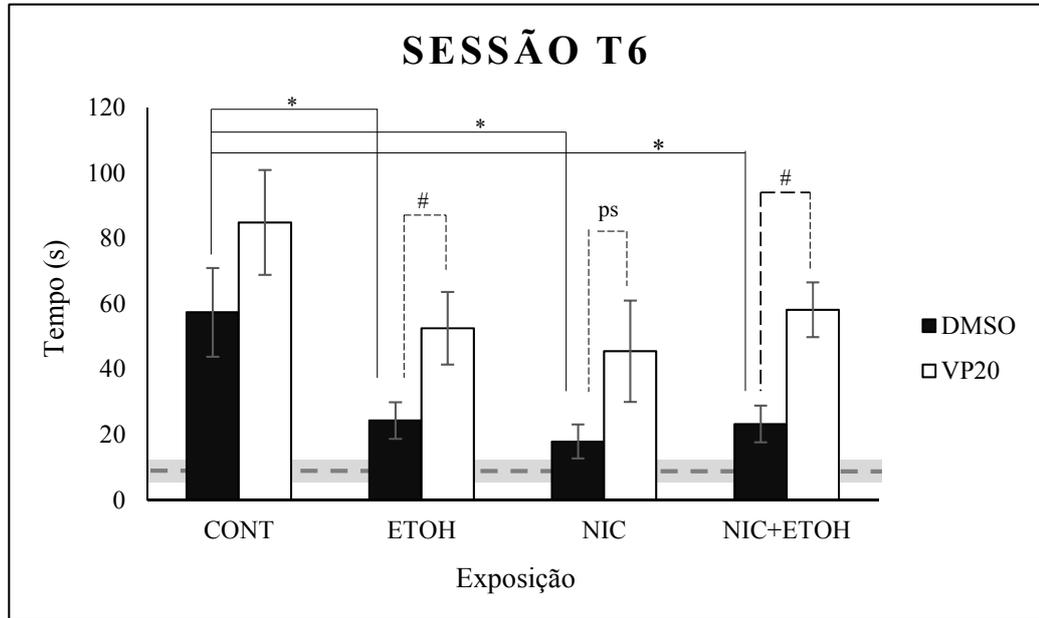
Fonte: A autora, 2017.

3.4.2 Esquiva Passiva

Levando em consideração que o teste foi realizado em três sessões: T0, T6 e T24, inicialmente realizamos uma rANOVA que avaliou a latência para descida da plataforma utilizando, além dos fatores descritos nos Materiais e Métodos, SESSÃO como fator de repetição. Essa análise indicou que a latência para descer da plataforma variou em função da sessão experimental (SESSÃO: $F_{2,246} = 52,66$; $p < 0,0001$), o que reflete o fato de que houve aumento nas latências em T6 e T24 quando comparadas a T0. Este resultado indica que o teste foi eficiente, ou seja, os animais aprenderam que descer da plataforma em T0 resulta em um estímulo negativo e, subsequentemente (em T6 e T24), aumentam o tempo de permanência na plataforma. Apesar disso, essa resposta de aumento da latência não foi uniforme entre os grupos experimentais (NIC*SESSÃO: $F_{2,246} = 3,95$; $p = 0,02$; ETOH*SESSÃO: $F_{2,246} = 8,18$; $p = 0,0004$), o que sugere que os animais previamente expostos a nicotina e etanol apresentaram comportamento distinto daquele apresentado pelos animais controle ao longo das sessões realizadas na adolescência. Finalmente, essa rANOVA inicial indicou que o tratamento agudo com vimpocetina afetou de forma significativa os resultados (TRAT: $F_{1,123} = 15,16$; $p \leq 0,0002$). Com base nesses efeitos e interações, analisamos o comportamento dos grupos experimentais separadamente em cada sessão.

Em T0, não observamos efeitos significativos entre os grupos. Em T6, os animais previamente expostos ao etanol e/ou a nicotina apresentaram déficits de memória quando comparamos aos animais controle. ($CONT_{DMSO} > ETOH_{DMSO}$: $P = 0,027$; $CONT_{DMSO} > NIC_{DMSO}$: $P = 0,012$; $CONT_{DMSO} > NIC+ETOH_{DMSO}$: $P = 0,038$). O tratamento com a vimpocetina foi capaz de reduzir os déficits provocados pela exposição as drogas ($ETOH_{DMSO} < ETOH_{VP20}$: $P = 0,045$; $NIC+ETOH_{DMSO} < NIC+ETOH_{VP20}$: $P = 0,040$; $NIC_{DMSO} > NIC_{VP20}$: $P = 0,083$ – próximo a significância) (Figura 21).

Figura 21. Latência para descer da plataforma, em até 180 segundos, no teste da esquiua passiva, na sessão T6 dos animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que uma hora antes da primeira sessão (T0), receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO)

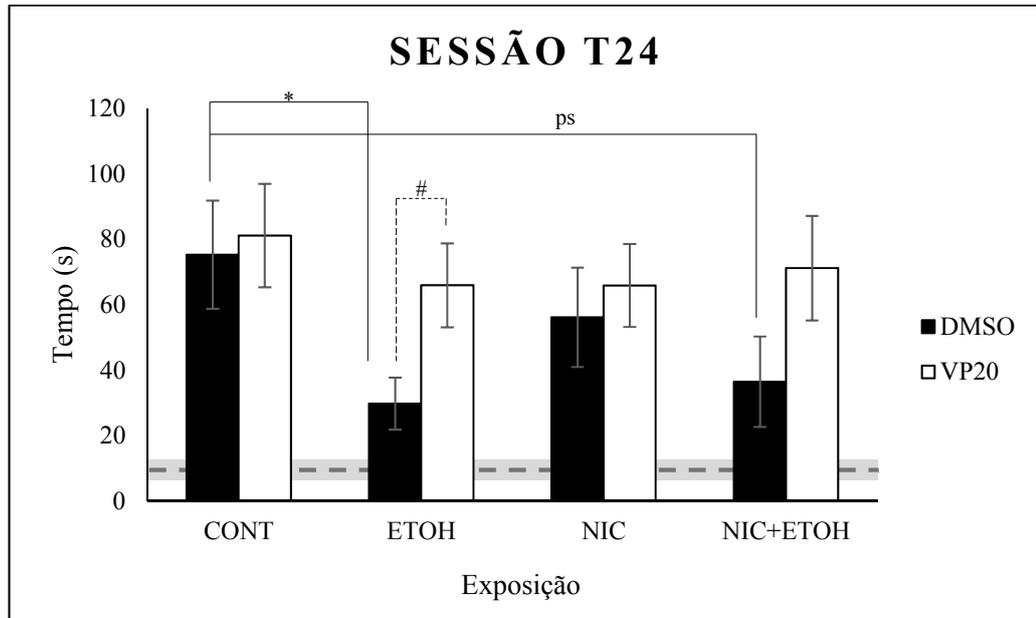


Legenda: ($CONT_{DMSO} = 17$; $CONT_{VP20} = 18$; $ETOH_{DMSO} = 21$, $ETOH_{VP20} = 21$; $NIC_{DMSO} = 17$; $NIC_{VP20} = 16$; $NIC+ETOH_{DMSO} = 14$; $NIC+ETOH_{VP20} = 15$). Valores representam média \pm EPM. * para $p > 0,05$ nas comparações entre grupos DMSO. # para $p > 0,05$ nas comparações entre os grupos DMSO e VP20. Ps, próximo significância ($0,05 > p < 0,1$). Onde: Média da sessão de treino = 14 e Erro da sessão de treino = 1,5.

Fonte: A autora, 2017.

Em T24, os animais previamente expostos ao etanol apresentaram déficits de memória quando comparamos ao animais controle ($CONT_{DMSO} > ETOH_{DMSO}$: $P=0,017$). O tratamento com vimpocetina foi capaz de reduzir os déficits provocados pela exposição ao etanol ($ETOH_{DMSO} < ETOH_{VP20}$: $P= 0,044$) (Figura 22).

Figura 22. Latência para descer da plataforma, em até 180 segundos, no teste da esquiua passiva, na sessão T24 dos animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol intraperitoneal durante o desenvolvimento e que uma hora antes da primeira sessão (T0), receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO).



Legenda: (CONT_{DMSO}= 17; CONT_{VP20}= 18; ETOH_{DMSO}= 21, ETOH_{VP20}= 21; NIC_{DMSO}= 17; NIC_{VP20}= 16; NIC+ETOH_{DMSO}= 14; NIC+ETOH_{VP20}= 15). Valores representam média ±EPM. * para $p > 0,05$ nas comparações entre grupos DMSO. # para $p > 0,05$ nas comparações entre os grupos DMSO e VP20. Ps, próximo a significância ($0,05 > p < 0,1$).

Onde: — — Média da sessão de treino =14 e Erro da sessão de treino = 1,5.

Fonte: A autora, 2017.

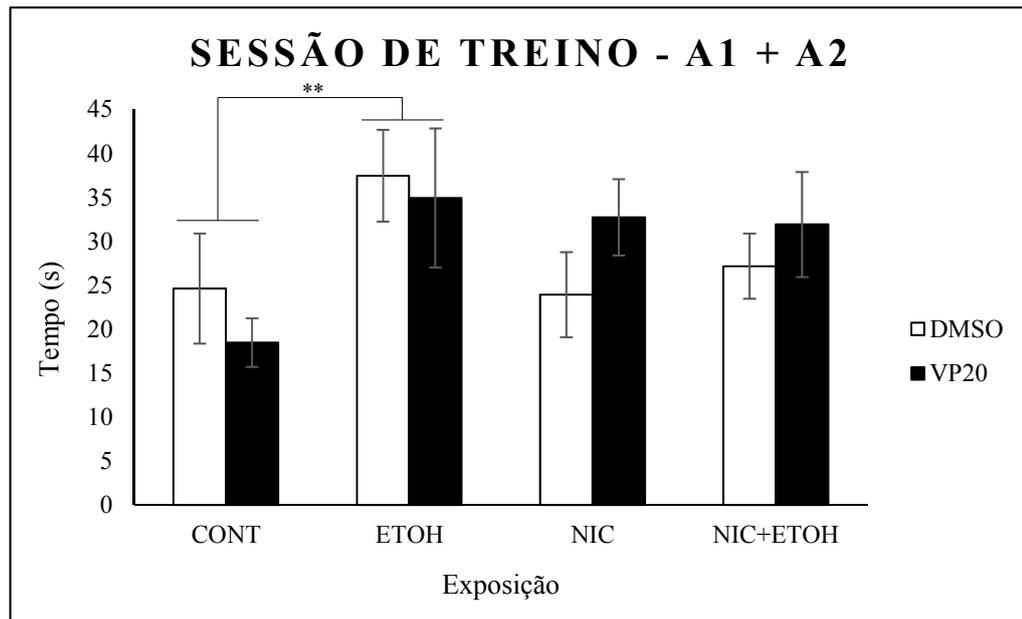
3.4.3 Reconhecimento de Objetos

3.4.3.1 Atividade exploratória total direcionada aos objetos (obj 1 + obj 2)

Ao analisar a interação entre os objetos A1 e A2 na sessão de treino, não observamos efeitos ou interações com o fator Tratamento. Contudo, a exposição prévia as drogas de abuso afetaram significativamente atividade dos animais (ETOH: $F_{1,106} = 6,256$; $p=0,014$; NIC*ETOH: $F_{1,106} = 4,05$; $p=0,0467$). De fato, verificamos que os animais expostos ao etanol precocemente, independente do tratamento, apresentaram um maior tempo de interação com os

dois objetos quando comparados com os animais controle (CONT < ETOH: P=0,005) (Figura 23).

Figura 23. Interação entre os objetos A1 e A2 durante a sessão de treino de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO).

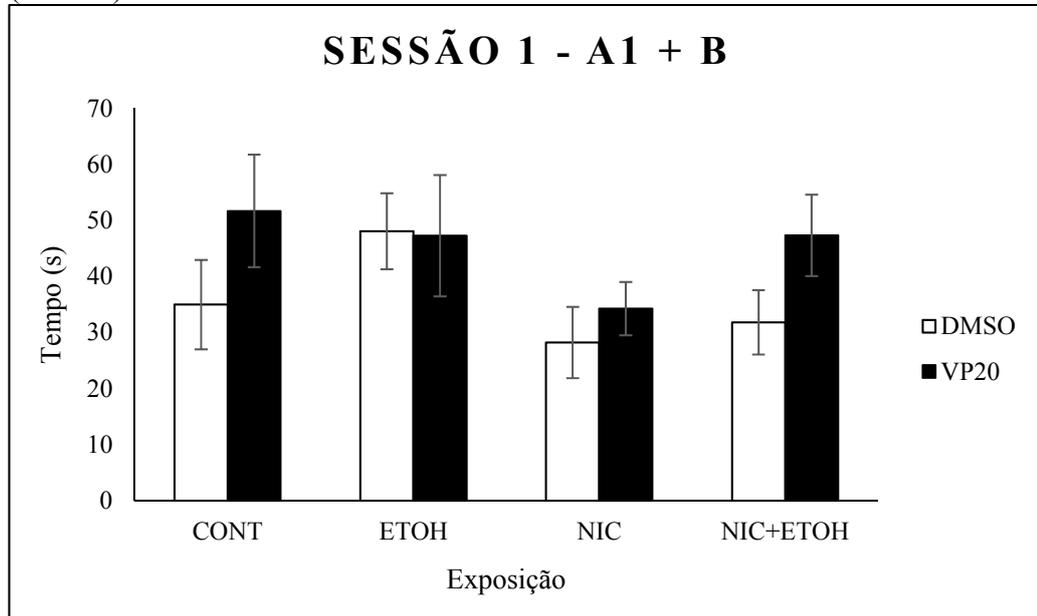


Legenda: (CONT_{DMSO}= 15; CONT_{VP20}= 14; ETOH_{DMSO}= 16, ETOH_{VP20}= 15; NIC_{DMSO}= 16; NIC_{VP20}= 15; NIC+ETOH_{DMSO}= 15; NIC+ETOH_{VP20}= 16). Valores representam média ±EPM. ** para p > 0,01 nas comparações entre grupos DMSO .

Fonte: A autora, 2017.

Na sessão 1, não encontramos diferenças significativas entre os grupos e tratamentos (Figura 24).

Figura 24. Interação entre os objetos A1 e B durante a sessão 1 de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que, duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO).

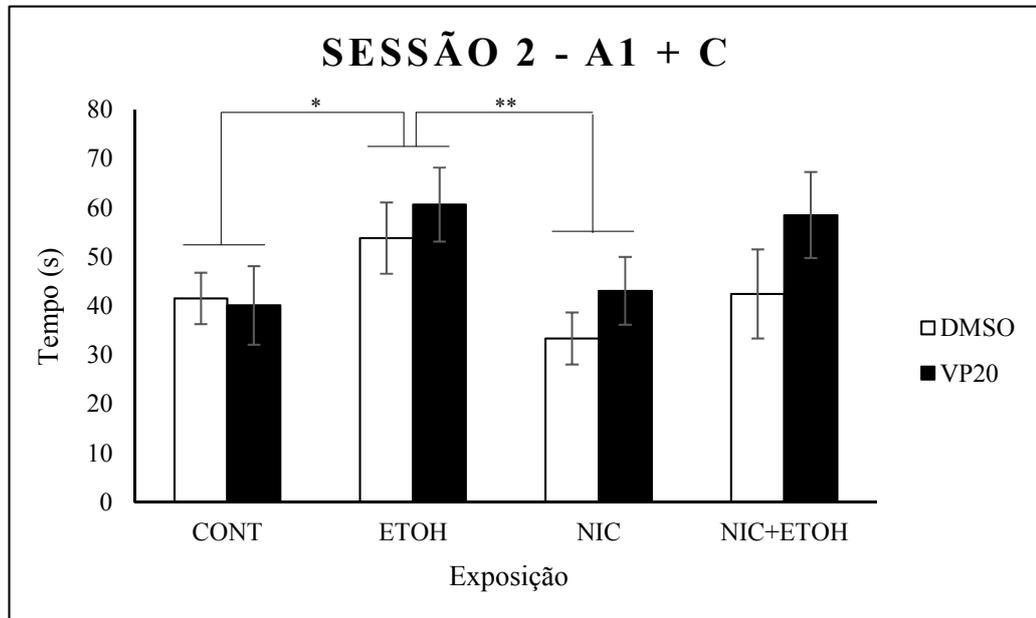


Legenda: (CONT_{DMSO}= 15; CONT_{VP20}= 14; ETOH_{DMSO}= 16, ETOH_{VP20}= 15; NIC_{DMSO}= 16; NIC_{VP20}= 15; NIC+ETOH_{DMSO}= 15; NIC+ETOH_{VP20}= 16). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2017.

Na última sessão (sessão 2), novamente fica evidente que a exposição prévia ao etanol afeta a atividade exploratória do camundongo adolescente (ETOH: $F_{1,106} = 7,016$; $p=0,009$). Os animais que foram expostos ao etanol, independente do tratamento, quando comparados aos animais controle, apresentaram maior tempo de interação com os objetos (CONT < ETOH: $P=0,03$). (Figura 25).

Figura 25. Interação entre os objetos A1 e C durante a sessão 2 de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol intraperitoneal durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO)



Legenda: (CONT_{DMSO} = 15; CONT_{VP20} = 14; ETOH_{DMSO} = 16; ETOH_{VP20} = 15; NIC_{DMSO} = 16; NIC_{VP20} = 15; NIC+ETOH_{DMSO} = 15; NIC+ETOH_{VP20} = 16). Valores representam média ±EPM. * para $p > 0,05$ e ** para $p > 0,01$.

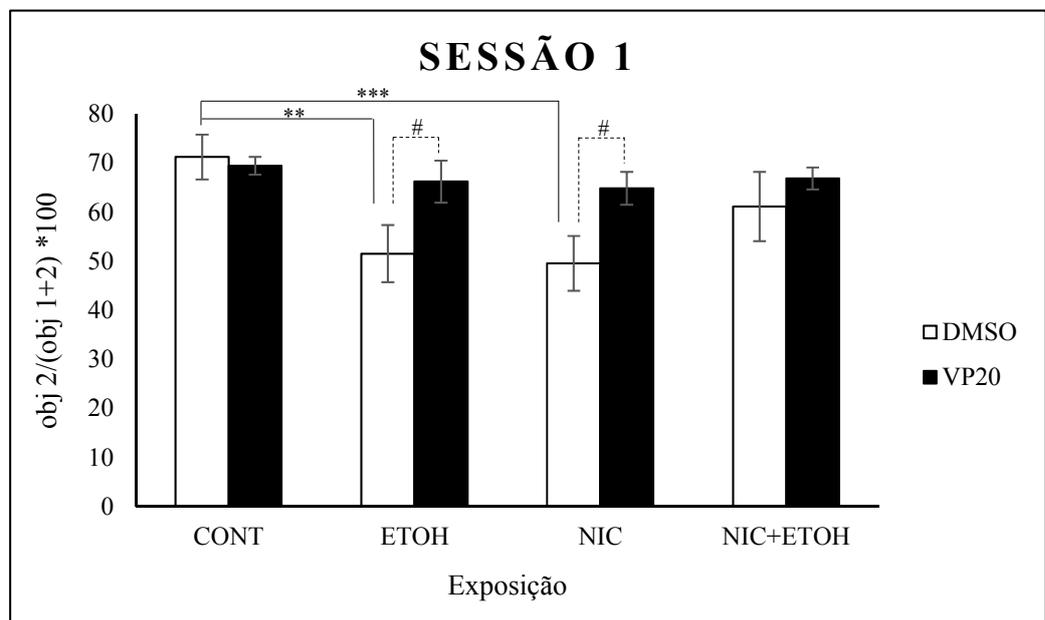
Fonte: A autora, 2017.

3.4.3.2 Memória/aprendizado (índice: obj 2/(obj 1+2) *100)

O índice $\text{obj 2}/(\text{obj 1}+\text{obj 2}) * 100$ foi usado como medida de memória/aprendizado. Na sessão 1, as análises mostraram interação entre as duas drogas (NIC*ETOH: $F_{1,106} = 7,66$; $p=0,006$). Observamos um déficit de memória/aprendizado nos grupos que receberam nicotina e etanol separadamente (CONT_{DMSO} > ETOH_{DMSO}: $P=0,003$ e CONT_{DMSO} < NIC_{DMSO}: $P=0,001$). Ou seja, esses animais obtiveram um menor percentual de exploração no objeto novo (B) quando comparado ao objeto antigo (A1), já conhecido durante a sessão de treino. Porém, não observamos essa alteração de memória nos animais que receberam as drogas de forma conjunta (CONT_{DMSO} = NIC+ETOH_{DMSO}: $P=0,132$). Adicionalmente, encontramos efeito do tratamento (TRAT: $F_{1,106} = 5,24$; $p=0,024$). A vimpocetina foi capaz de restaurar a memória/aprendizado dos animais que receberam as drogas isoladamente (ETOH_{DMSO} < ETOH_{VP20}: $P=0,027$; NIC_{DMSO} < NIC_{VP20}: $P=0,021$). Ou seja, o tratamento fez com que os animais expostos a

nicotina e ao etanol aumentassem o percentual de exploração no objeto novo, quando comprados aos animais expostos a nicotina ou etanol mas não tratados com vimpocetina (Figura 26).

Figura 26. Índice $\text{obj 2}/(\text{obj 1+2}) * 100$ durante a primeira sessão de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO).

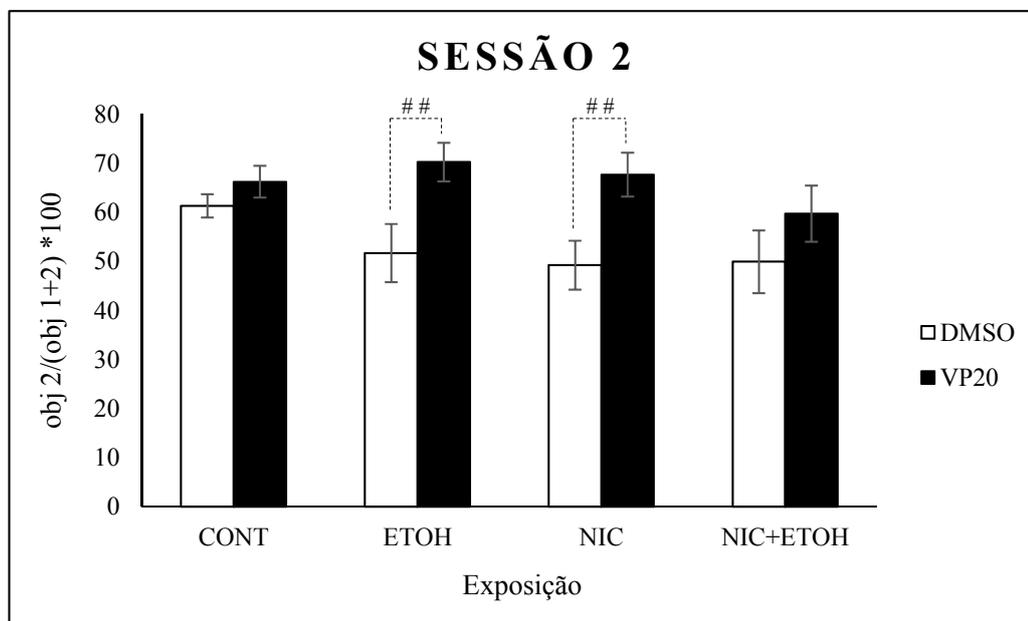


Legenda: ($\text{CONT}_{\text{DMSO}} = 15$, $\text{CONT}_{\text{VP20}} = 14$; $\text{ETOH}_{\text{DMSO}} = 16$, $\text{ETOH}_{\text{VP20}} = 15$; $\text{NIC}_{\text{DMSO}} = 16$; $\text{NIC}_{\text{VP20}} = 15$; $\text{NIC+ETOH}_{\text{DMSO}} = 15$; $\text{NIC+ETOH}_{\text{VP20}} = 16$). Valores representam média \pm EPM. ** para $p > 0,01$ e *** para $p > 0,001$ nas comparações entre grupos DMSO. # para $p > 0,05$ nas comparações entre os grupos DMSO e VP20.

Fonte: A autora, 2017.

Na sessão 2 e última sessão, também encontramos efeito do tratamento (TRAT: $F_{1,106} = 12,44$; $p = 0,0006$). Os animais que foram expostos precocemente a nicotina ou etanol e tratados com vimpocetina, tiveram um aumento na exploração no objeto novo, quando comprados aos animais do mesmo grupo que foram tratados com o DMSO. ($\text{ETOH}_{\text{DMSO}} < \text{ETOH}_{\text{VP20}}$: $P = 0,007$ $\text{NIC}_{\text{DMSO}} < \text{NIC}_{\text{VP20}}$: $P = 0,008$), sugerindo que a VP20 foi capaz de reverter danos de memória/aprendizado provocados pela exposição as drogas de abuso (Figura 27).

Figura 27. Índice obj 2/(obj 1+2) *100 durante a segunda sessão de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol intraperitoneal durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO).



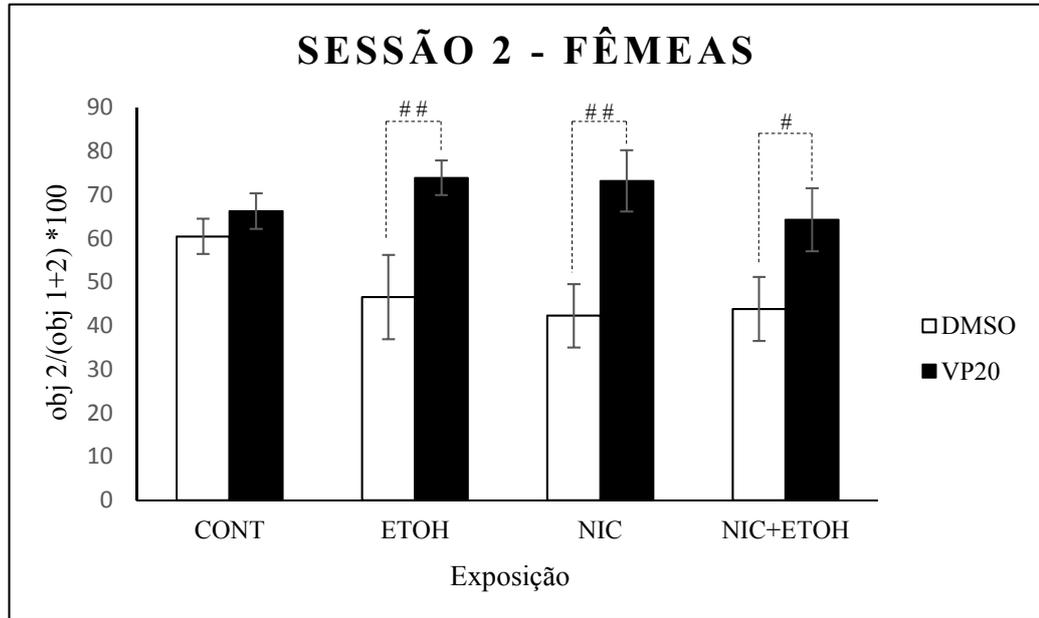
Legenda: (CONT_{DMSO}= 15, CONT_{VP20}= 14; ETOH_{DMSO}= 16, ETOH_{VP20}= 15; NIC_{DMSO}= 16; NIC_{VP20}= 15; NIC+ETOH_{DMSO}= 15; NIC+ETOH_{VP20}= 16). Valores representam média ±EPM. ## para p > 0,01 nas comparações entre os grupos DMSO e VP20.

Fonte: A autora, 2017

Nesta última sessão, os déficits de memória/aprendizado não alcançaram significância estatística. É possível que o maior intervalo entre a sessão Treino e a última sessão (Sessão 2), 24 horas, quando comparado com o intervalo de 6 horas entre o Treino e a Sessão 1, tenha feito com que os animais tratados com vimpocetina esquecessem do objeto A1, não o reconhecendo como objeto antigo.

Além do efeito do Tratamento na Sessão 2 encontramos uma interação entre tratamento e sexo (TRAT*SEXO: $F_{1,106} = 6,467$; $p=0,012$), o que sugere que o efeito do tratamento foi diferenciado entre os sexos. Para fêmeas, observamos que o tratamento com vimpocetina causou um aumento na interação com o objeto novo (C) quando comparado as fêmeas tratadas com DMSO (ETOH_{DMSO} < ETOH_{VP20}: $P=0,003$; NIC_{DMSO} < NIC_{VP20}: $P=0,003$; NIC+ETOH_{DMSO} < NIC+ETOH_{VP20}: $P=0,037$) (Figura 28). Não houve efeitos significativos para machos (Figura 29).

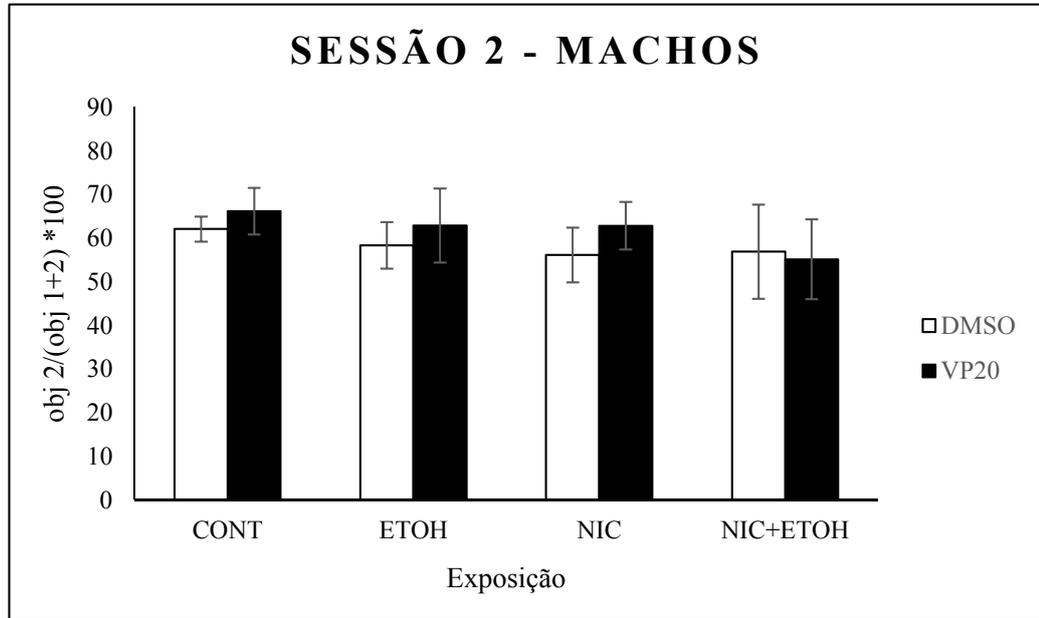
Figura 28. Índice $\text{obj 2}/(\text{obj 1+2}) * 100$ pra fêmeas durante a segunda sessão de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO).



Legenda: ($\text{CONT}_{\text{DMSO}} = 7$, $\text{CONT}_{\text{VP20}} = 7$; $\text{ETOH}_{\text{DMSO}} = 9$, $\text{ETOH}_{\text{VP20}} = 10$; $\text{NIC}_{\text{DMSO}} = 8$; $\text{NIC}_{\text{VP20}} = 7$; $\text{NIC+ETOH}_{\text{DMSO}} = 8$; $\text{NIC+ETOH}_{\text{VP20}} = 8$). Valores representam média \pm EPM. ## para $p > 0,01$ nas comparações entre os grupos DMSO e VP20.

Fonte: A autora, 2017

Figura 29. Índice $\text{obj } 2/(\text{obj } 1+2) * 100$ pra machos durante a segunda sessão de animais que foram expostos à nicotina e/ou etanol durante o desenvolvimento e que duas horas antes da sessão de treino, receberam injeção de vimpocetina na dose de 20mg/Kg ou dimetilsulfóxido (DMSO).



Legenda: ($\text{CONT}_{\text{DMSO}} = 8$, $\text{CONT}_{\text{VP20}} = 7$; $\text{ETOH}_{\text{DMSO}} = 7$, $\text{ETOH}_{\text{VP20}} = 5$; $\text{NIC}_{\text{DMSO}} = 8$; $\text{NIC}_{\text{VP20}} = 8$; $\text{NIC+ETOH}_{\text{DMSO}} = 7$; $\text{NIC+ETOH}_{\text{VP20}} = 8$). Valores representam média \pm EPM.

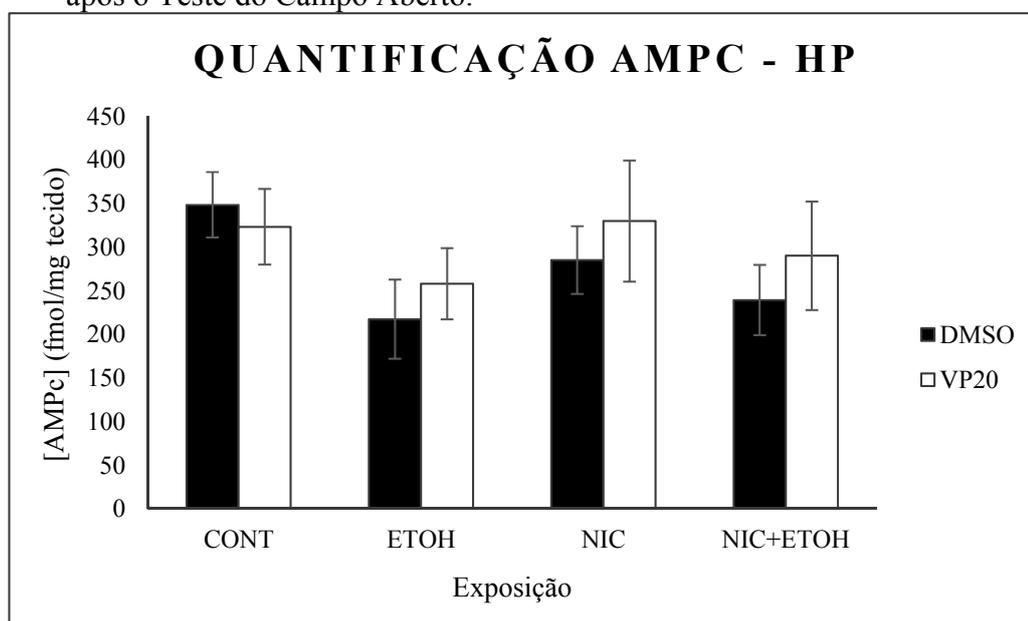
Fonte: A autora, 2017

3.5. Quantificação de AMPc

3.5.1. No hipocampo

Ao realizar a análise estatística não encontramos efeitos ou interações entre as drogas de abuso e o tratamento com vimpocetina (Figura 30).

Figura 30. Quantificação de AMPc realizado por um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, no hipocampo de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto.



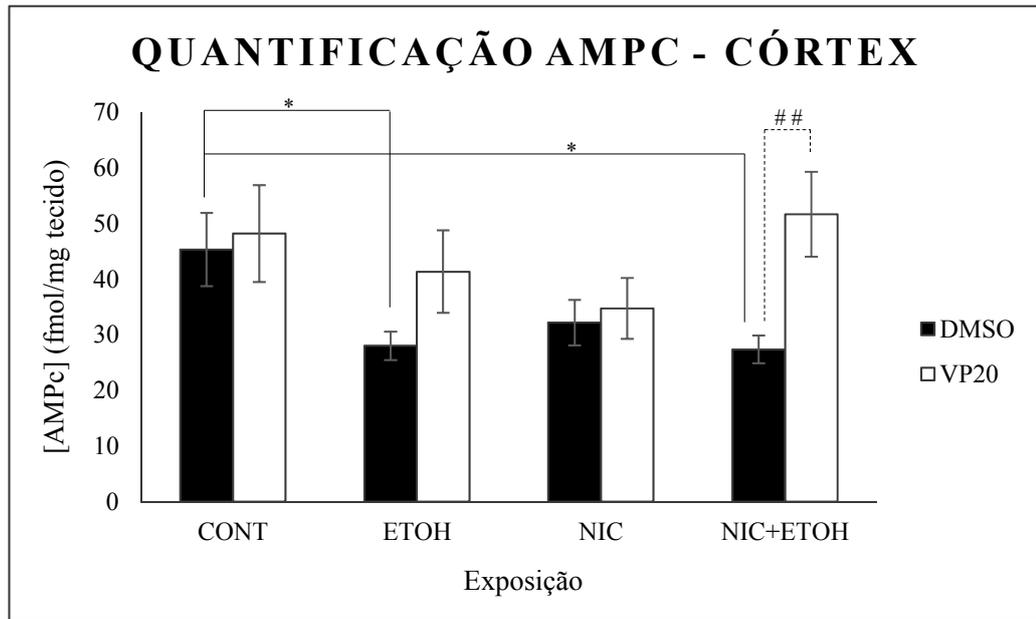
Legenda: (CONT_{DMSO}= 13; CONT_{VP20}= 13; ETOH_{DMSO}= 8, ETOH_{VP20}= 14; NIC_{DMSO}= 12; NIC_{VP20}= 13; NIC+ETOH_{DMSO}= 14; NIC+ETOH_{VP20}= 12). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2017

3.5.2 No córtex

Diferente do descrito para o hipocampo, no córtex, a análise estatística mostrou efeito da exposição as drogas (NIC*ETOH: $F_{1,64} = 4,47$; $p=0,038$) e do tratamento com vimpocetina (TRAT: $F_{1,64} = 7,02$; $p=0,01$). A exposição precoce ao etanol e etanol+nicotina, foi capaz de reduzir a quantidade de AMPc no córtex de forma significativa (CONT_{DMSO} > ETOH_{DMSO}: $P=0,041$; CONT_{DMSO} > NIC+ETOH_{DMSO}: $P=0,035$). Contudo, o efeito da vimpocetina ficou evidente somente no grupo exposto as duas drogas precocemente. Animais deste grupo, que foram tratados com vimpocetina, apresentaram aumento nos níveis de AMPc quando comparados aos animais deste mesmo grupo, tratado com DMSO (NIC+ETOH_{DMSO} < NIC+ETOH_{VP20}: $P=0,006$) (Figura 31).

Figura 31. Quantificação de AMPc realizado por um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, no córtex de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto.



Legenda: ($CONT_{DMSO} = 11$; $CONT_{VP20} = 10$; $ETOH_{DMSO} = 9$, $ETOH_{VP20} = 8$; $NIC_{DMSO} = 10$; $NIC_{VP20} = 13$. $NIC+ETOH_{DMSO} = 9$; $NIC+ETOH_{VP20} = 10$). Valores representam média \pm EPM. * para $p > 0,05$ nas comparações entre grupos DMSO. ## para $p > 0,01$ nas comparações entre os grupos DMSO e VP20.

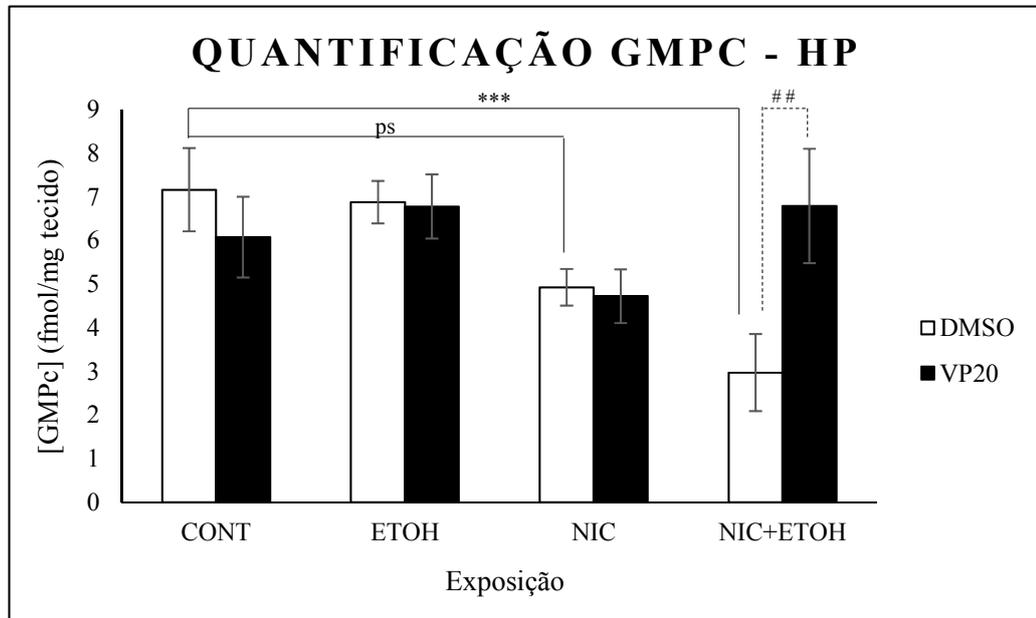
Fonte: A autora, 2017

3.6 Quantificação de GMPc

3.6.1 No hipocampo

Em relação a quantificação de GMPc no hipocampo, a análise estatística mostrou um efeito da nicotina. (NIC: $F_{1,45} = 10,239$; $p=0,002$). Este efeito reflete uma redução nos níveis de GMPc nos animais adolescentes previamente expostos a nicotina ($CONT_{DMSO} > NIC_{DMSO}$: $P=0,066$ – próximo da significância), efeito esse intensificado pela exposição combinada a nicotina+etanol ($CONT_{DMSO} > NIC+eETOH_{DMSO}$: $P=0,001$). Adicionalmente, encontramos uma interação entre a nicotina e o tratamento (NIC*TRAT: $F_{1,45} = 4,20$; $p=0,046$) como também, entre o etanol e o tratamento (ETOH*TRAT: $F_{1,45} = 4,56$; $p=0,038$). Animais que foram expostos a nicotina e ao etanol combinados, e tratados com a vimopcetina, tiveram aumento de GMPc no hipocampo quando comparados aos animais tratados com DMSO do mesmo grupo ($NIC+ETOH_{DMSO} < NIC+ETOH_{VP20}$: $P=0,002$) (Figura 32).

Figura 32. Quantificação de GMPC realizada por um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, no hipocampo de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto.



Legenda: (CONT_{DMSO} = 7; CONT_{VP20} = 9; ETOH_{DMSO} = 6, ETOH_{VP20} = 8; NIC_{DMSO} = 8; NIC_{VP20} = 8; NIC+ETOH_{DMSO} = 8; NIC+ETOH_{VP20} = 7). Valores representam média ±EPM. *** para $p > 0,001$ nas comparações entre grupos DMSO. ## para $p > 0,01$ nas comparações entre os grupos DMSO e VP20. Ps, próximo a significância ($0,05 > p < 0,1$).

Fonte: A autora, 2017.

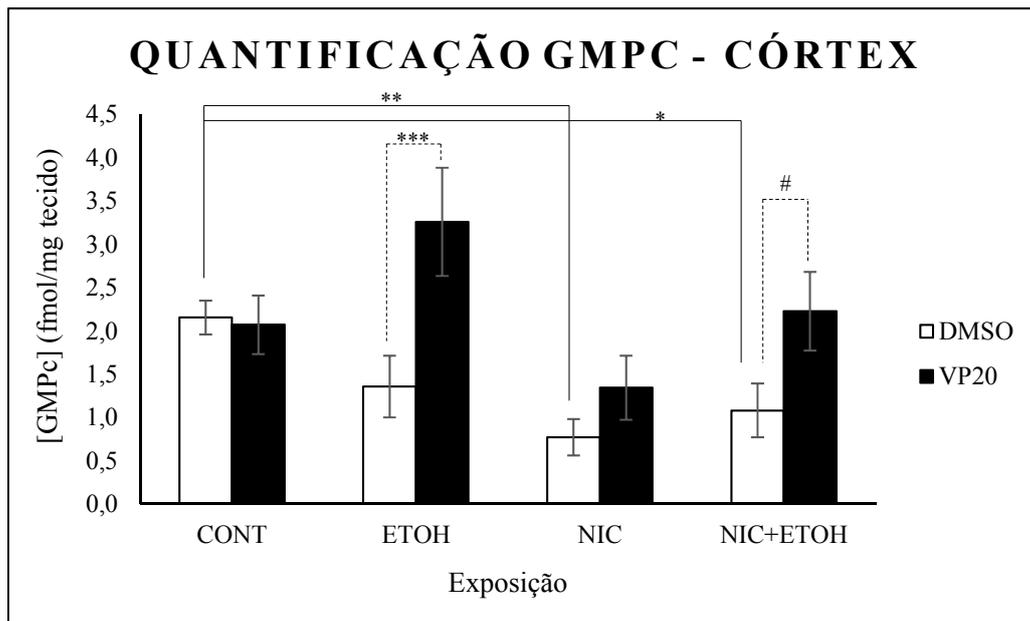
3.6.2 No córtex

Em relação a quantificação de GMPC no córtex, a análise estatística mostrou um efeito da nicotina (NIC: $F_{1,67} = 11,04$; $p=0,001$), assim como um efeito do tratamento (TRAT: $F_{1,67} = 13,67$; $p=0,0004$) e uma interação entre o etanol e o tratamento (ETOH*TRAT: $F_{1,67} = 5,97$; $p=0,017$).

A exposição precoce a nicotina e nicotina+etanol reduziram os níveis de GMPC no córtex de camundongos adolescentes (CONT_{DMSO} > NIC_{DMSO}: $P = 0,006$; CONT_{DMSO} > ETOH_{DMSO}: $P = 0,027$). A vimpocetina reverteu e redução dos níveis de GMPC no grupo exposto a nicotina+etanol (NIC+ETOH_{DMSO} < NIC+ETOH_{VP20}: $P = 0,02$). Quanto aos animais expostos ao etanol, apesar de a redução dos níveis de GMPC não ter sido significativa, o tratamento com

vimpocetina causou aumento de GMPc quando comparados aos animais tratados com DMSO do mesmo grupo ($ETOH_{DMSO} < ETOH_{VP20}$: $P = 0,0005$) (Figura 33).

Figura 33. Quantificação de GMPc realizado por um ensaio imuno enzimático da GE Healthcare, Biotrak, no córtex de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto.



Legenda: ($CONT_{DMSO} = 12$; $CONT_{VP20} = 10$; $ETOH_{DMSO} = 9$, $ETOH_{VP20} = 9$; $NIC_{DMSO} = 9$; $NIC_{VP20} = 13$; $NIC+ETOH_{DMSO} = 10$; $NIC+ETOH_{VP20} = 11$). Valores representam média \pm EPM. * para $p > 0,05$, ** para $p > 0,01$ e *** para $p > 0,001$ nas comparações entre grupos DMSO. # para $p > 0,05$ nas comparações entre os grupos DMSO e VP20.

Fonte: A autora, 2017

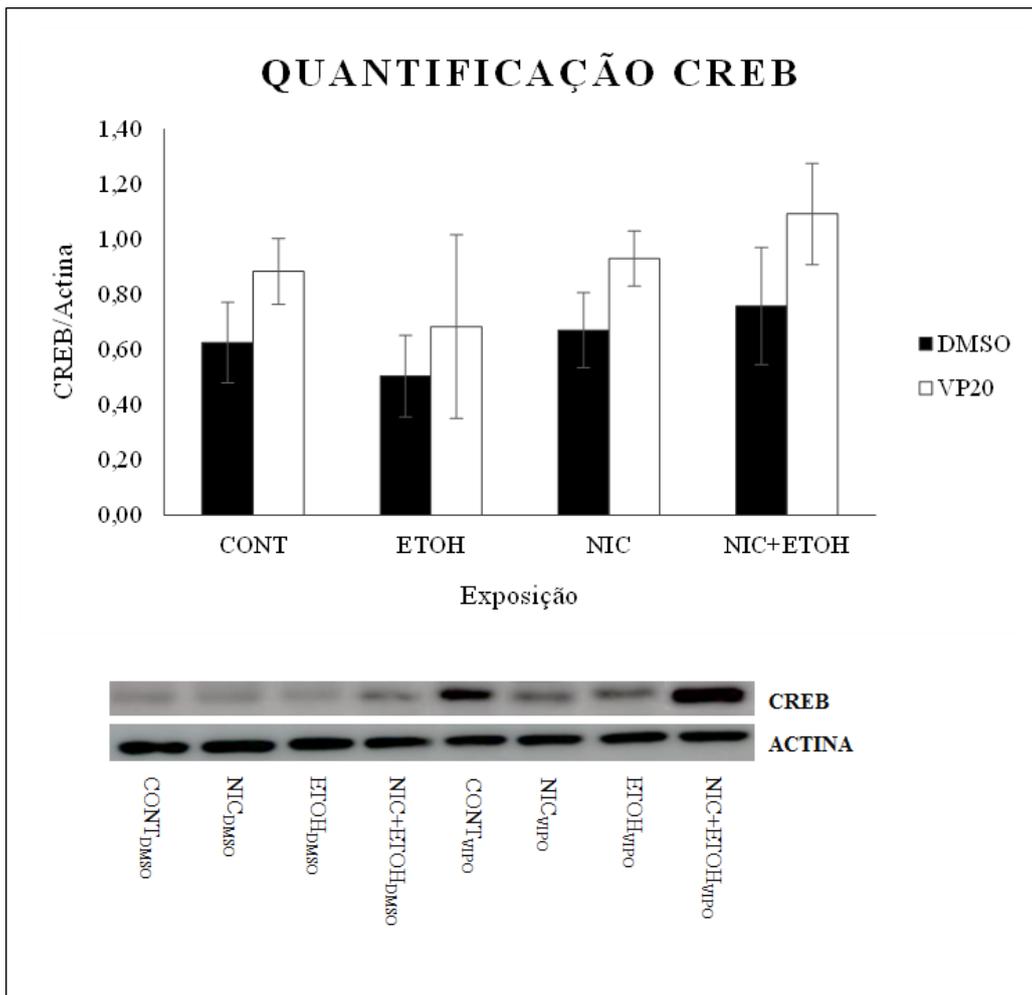
3.7 Quantificação CREB e pCREB

3.7.1 CREB

Ao analisar o CREB total no córtex, observamos um efeito do tratamento (TRAT: $F_{1,75} = 4,287$; $p = 0,04$), indicando aumento na expressão do CREB em resposta ao tratamento com vimpocetina em camundongos adolescentes. A exposição precoce as drogas de abuso não interferiram nos níveis de CREB total. Adicionalmente, não houve interação entre os fatores NIC, ETOH, Tratamento e Sexo. Esse efeito do tratamento, apesar de significativo, desaparece

quando avaliamos os grupos experimentais em separado. Nesse caso, as diferenças entre os grupos DMSO e VP20 não atingem significância (Figura 34).

Figura 34. Expressão de CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca⁺⁺) por Western Blotting no córtex esquerdo de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto.



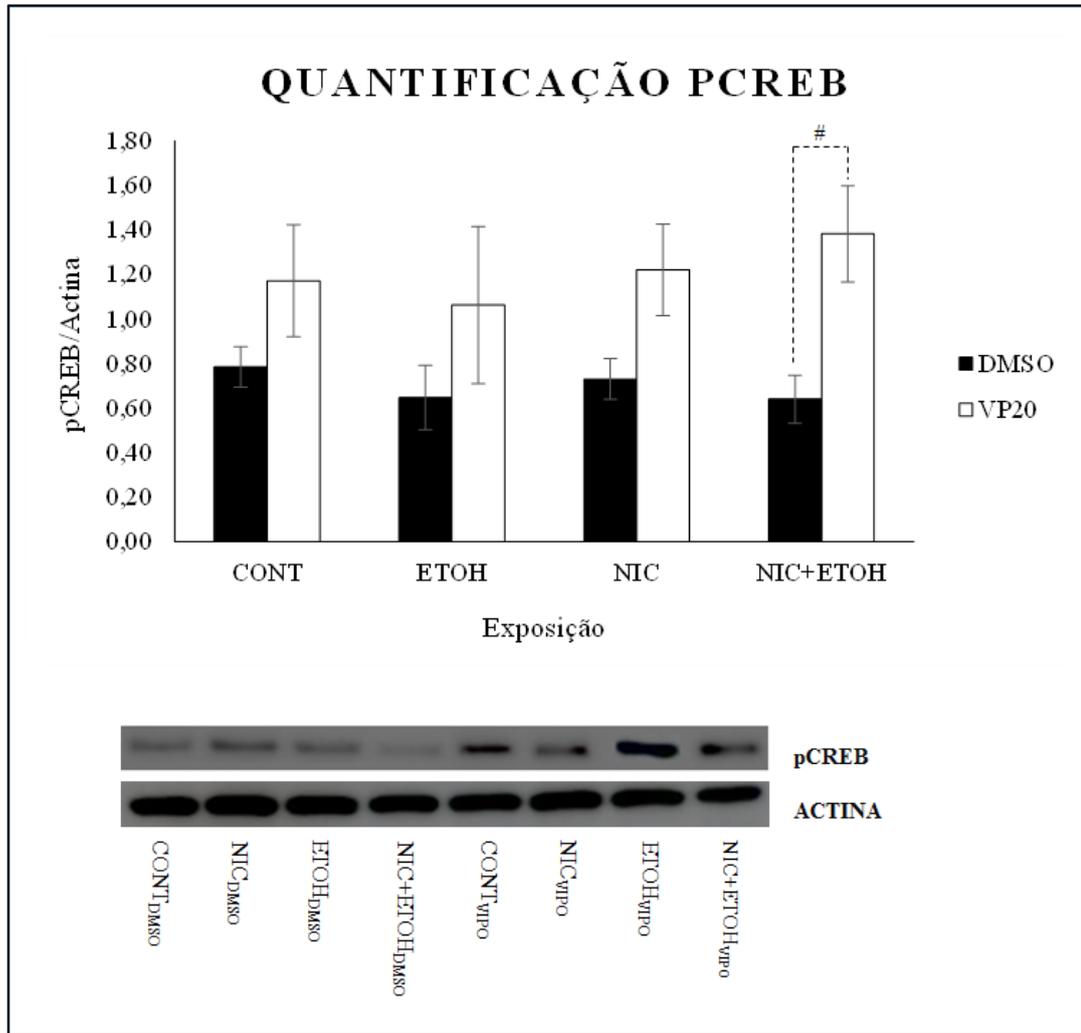
Legenda: (CONT_{DMSO}= 12; CONT_{VP20}= 12; ETOH_{DMSO}= 12, ETOH_{VP20}= 10; NIC_{DMSO}= 12; NIC_{VP20}= 12; NIC+ETOH_{DMSO}= 11; NIC+ETOH_{VP20}= 10). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2017

3.7.2 pCREB

Ao realizar a análise estatística relacionada a expressão do pCREB no córtex, novamente observamos efeito do tratamento com vimpocetina (TRAT: $F_{1,75} = 11,938$; $p = 0,0009$), o que indica aumento na expressão do pCREB em resposta ao tratamento com vimpocetina em camundongos adolescentes. A exposição precoce as drogas de abuso não interferiram nos níveis de CREBp. Adicionalmente, não houve interação entre os fatores NIC, ETOH, Tratamento e Sexo. Interessantemente, quando analisamos os grupos experimentais em separado, o efeito do tratamento somente alcança significância estatística nos animais previamente expostos a combinação entre as drogas ($NIC+ETOH_{DMSO} < NIC+ETOH_{VP20}$: $P = 0,02$) (Figura 35).

Figura 35. Expressão de pCREB (proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca⁺⁺ fosforilada) por Western Blotting no córtex esquerdo de camundongos sacrificados imediatamente após o Teste do Campo Aberto.



Legenda: (CONTDMSO= 12; CONTVP20= 12; ETOHDMSO= 12, ETOHVP20= 11; NICDMSO= 12; NICVP20= 12; NIC+ETOH_{DMSO}= 10; NIC+ETOH_{VP20}= 10). Valores representam média ±EPM. # para $p > 0,05$ nas comparações entre os grupos DMSO e VP20.

Fonte: A autora, 2017

4 DISCUSSÃO

4.1 Resumo dos resultados:

➤ *Massa corporal:*

- Camundongos machos adolescentes que receberam etanol precocemente e foram submetidos ao Teste da Esquiva Passiva e Campo Aberto, apresentaram uma diminuição da massa corporal.
- Camundongos machos adolescentes submetidos ao Teste do Reconhecimento de Objetos e que foram expostos a nicotina e ao etanol de forma combinada, tiveram redução da massa corporal bem como àqueles expostos somente ao etanol.

Em relação a análise relativa aos testes comportamentais observamos que:

➤ *Teste do Campo Aberto:*

- Houve um aumento da atividade locomotora somente no grupo NIC+ETOH. Adicionalmente, neste grupo, o tratamento com vimpocetina foi capaz de reduzir a atividade até os níveis do grupo controle.
- Aumento da atividade não alcançou significância nos grupos expostos somente a nicotina ou etanol, contudo a vimpocetina reduziu a atividade nos animais ETOH.
- Efeito ansiogênico do etanol.

➤ *Teste da Esquiva Passiva (T0, T6 e T24):*

- T6: animais expostos ao etanol e/ou a nicotina apresentaram déficits de memória quando comparamos aos animais controle.

- T6: o tratamento com a vimpocetina foi capaz de reduzir os déficits provocados pela exposição as drogas isoladas ou conjuntamente.
- T24: somente os animais previamente expostos ao etanol apresentaram déficits de memória.
- T24: o tratamento com vimpocetina foi capaz de reduzir os déficits provocados pela exposição ao etanol.

➤ ***Teste do Reconhecimento de Objetos (Sessão de Treino, Sessão 1 e Sessão 2):***

- Sessão de treino: exposição ao etanol independente do tratamento, provocou um maior tempo de interação com os dois objetos quando comparados com os animais controle.
- Sessão 1: observamos um déficit de memória/aprendizado nos grupos que receberam nicotina e etanol separadamente, ou seja, esses animais obtiveram um menor percentual de exploração no objeto novo (B) quando comparado ao objeto antigo (A1), já conhecido durante a sessão de treino.
- Sessão 1: vimpocetina foi capaz de restaurar a memória/aprendizado dos animais que receberam as drogas isoladamente, ou seja, o tratamento fez com ela que os animais aumentassem o percentual de exploração no objeto novo.
- Sessão 2: resultado semelhante ao de cima, etanol foi capaz de provocar maior tempo de interação com os objetos.
- Sessão 2: animais expostos a nicotina ou etanol e tratados com vimpocetina, tiveram um aumento na exploração no objeto novo, sugerindo que a VP20 foi capaz de reverter danos de memória/aprendizado provocados pelas drogas.
- Sessão 2: o tratamento com vimpocetina nas fêmeas dos grupos NIC, ETOH e NIC+ETOH, causou um aumento na interação com o objeto novo (C).

Já em relação a quantificação do AMPc (Córtex e hipocampo):

➤ **No córtex:**

- A exposição ao etanol e etanol+nicotina reduziu os níveis de AMPc.

- Tratamento com vimpocetina provocou aumento nos níveis de AMPc nos animais expostos a nicotina+etanol.

Em relação ao GMPc (Córtex e hipocampo):

➤ **No hipocampo:**

- A exposição a nicotina reduziu nos níveis de GMPc.
- A redução foi intensificada pela exposição combinada a nicotina+etanol.
- Animais tratados com vimpocetina e expostos a nicotina+etanol tiveram aumento de GMPc.

➤ **No córtex:**

- Exposição a nicotina e nicotina+etanol reduziram os níveis de GMPc.
- Vimpocetina foi capaz de reverter a redução dos níveis de GMPc no grupo exposto a nicotina+etanol .
- Quanto aos animais expostos ao etanol, apesar de a redução dos níveis de GMPc não ter sido significativa, o tratamento com vimpocetina causou aumento de GMPc.

Em relação a quantificação do CREB e CREBp no córtex:

➤ **CREB:**

- Aumento na expressão do CREB em resposta ao tratamento com vimpocetina..

➤ **CREBp**

- Aumento na expressão do pCREB em resposta ao tratamento com vimpocetina.
- A vimpocetina provocou um aumento nos níveis de CREBp de forma significativa somente nos animais expostos a nicotina+etanol.

Uma visão geral dos resultados indica que somente o grupo exposto a nicotina combinada com etanol durante o desenvolvimento perinatal apresentou hiperatividade no campo aberto. Este resultado foi distinto daquele identificado na análise da memória e aprendizado: O teste da esQUIVA passiva indicou que todos os grupos expostos as drogas apresentaram déficit. Já o teste de reconhecimento de objetos indicou déficits de memória nos animais expostos a nicotina ou etanol em separado.

O tratamento agudo com vimpocetina foi eficiente em mitigar os efeitos das drogas de abuso. No teste do campo aberto, o tratamento agudo reduziu a hiperatividade identificada no grupo exposto a nicotina combinada com etanol. No teste da esQUIVA passiva, a vimpocetina reduziu os déficits nos grupos previamente expostos a etanol e a nicotina+etanol. Já no teste de reconhecimento de objetos, a vimpocetina mitigou os déficits de memória causados pela nicotina e pelo etanol.

Em paralelo, a exposição precoce ao etanol e etanol+nicotina foi capaz de reduzir os níveis de AMPc cortical no período da adolescência. Quanto ao GMPc, a redução foi evidente no córtex cerebral e hipocampo dos animais expostos a nicotina e nicotina+etanol. Interessantemente, apesar dos efeitos do etanol e da nicotina em separado, o tratamento agudo dos animais adolescentes com vimpocetina reverteu a redução nos níveis de AMPc e GMPc somente nos animais previamente expostos a combinação entre as duas drogas de abuso. Estes resultados se refletiram nos níveis de CREB. Apesar de as drogas de abuso não terem causado efeitos significativos, o tratamento com vimpocetina causou aumento nos níveis de CREB e CREBp. Particularmente, o aumento dos níveis de CREBp foi mais intenso nos animais do grupo nicotina+etanol.

4.2 Vias de administração

Diversas técnicas de administração de etanol em roedores neonatos vêm sendo utilizadas tais como: a criação artificial (*pup in the cup model*), a administração por via oral (gavagem) e as câmaras de inalação de vapor de etanol (Diaz e Samson, 1980; Kelly e Lawrence, 2008; Pal e Alkana, 1997). Apesar da reprodutibilidade dos dados obtidos com estas técnicas, cada uma delas apresenta desvantagens e limitações. No presente estudo, utilizamos injeções intraperitoneais para administrar o etanol. Apesar do estresse causado pela manipulação dos animais durante o período de exposição e do risco de lesão de órgãos abdominais, esta técnica tem como aspectos positivos a simplicidade, a rapidez com que o etanol atinge o sistema

nervoso central assim como a possibilidade de corrigir a dose de álcool pelo peso dos animais. Nossos dados mostraram que não houve diferença de massa corporal entre os animais dos grupos etanol e o controle durante o período das injeções, e que a maioria dos animais sobreviveu às injeções, dado que está em acordo com os estudos anteriores realizados em camundongos (Filgueiras *et al.*, 2009) e em ratos (Filgueiras *et al.*, 2010) e que reforçam a segurança e exequibilidade desta via de administração. Esta via passou a ser bastante utilizada nos estudos realizados por nosso grupo para administrar o etanol e outras drogas em camundongos neonatos (Nunes-Freitas *et al.*, 2011, Oliveira-Pinto *et al.*, 2015).

O tratamento com a vimopocetina ou DMSO também foi realizado através de injeções intraperitoneais pelos mesmos motivos descritos acima, além do que, diversos estudos utilizam esse tipo de administração (Swart *et al.*, 2016; Nunes *et al.*, 2011; Filgueiras *et al.*, 2010).

Em relação a administração da nicotina, em modelos animais, diversas vias e formas de administração são utilizadas para realizar exposição à nicotina: via oral através da água de beber, via intraperitoneal ou subcutânea através de injeções únicas ou repetidas ou implantação de minibombas osmóticas e via inalatória através de máquinas de queima de cigarros para pesquisa, cada uma apresentando vantagens e desvantagens (Matta e colaboradores, 2007; Dickson e colaboradores, 2012). Neste trabalho, utilizamos a administração via água de beber com livre demanda. Devido ao gosto amargo da nicotina, diluíamos na água sacarina visando aumentar a palatabilidade da solução e evitar a redução da ingestão de líquido. De fato, tem sido demonstrado que a nicotina administrada via oral causa alterações comportamentais (Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2011; Abreu-Villaça *et al.*, 2008; Abreu-Villaça *et al.*, 2007; Adriani *et al.*, 2004, 2002; Gaddnas *et al.*, 2001) e bioquímicas incluindo a suprarregulação de receptores nicotínicos (Nuutinen *et al.*, 2005; Sparks & Pauly, 1999; Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2008, 2009), alteração dos níveis e metabolismo de monoaminas (Gaddnas *et al.*, 2000; Tammimaki *et al.*, 2006; Vihavainen *et al.*, 2006), bem como a alteração da expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica induzida por drogas de abuso (Marttila *et al.*, 2006).

4.3 Massa Corporal

Diversos estudos tem demonstrado que a administração de etanol através de injeções intraperitoneais não afeta o ganho de peso dos animais durante o tratamento neonatal, fato também observado neste estudo (Nunes *et al.*, 2011; Filgueiras *et al.*, 2009; Karaçay *et al.*, 2008; O'Leary-Moore *et al.*, 2006; Pal e Alkana, 1997). Porém, de forma interessante, aqui encontramos em PN30 e PN31 uma diminuição da massa corporal dos camundongos machos, provocada pela exposição precoce ao etanol e a nicotina+etanol. Recentemente, estudos tem demonstrado o mesmo. O peso corporal da prole aos 21 dias de idade foi diminuído pela exposição materna ao etanol durante a gravidez e lactação (Cesconetto *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram demonstrados anteriormente por Patten e colaboradores (2013). Ratos Long-Evans expostos ao etanol (5.25 g/kg/dia) via intubação gástrica do 4º ao 9º dia de vida pós natal também apresentaram diminuição da massa corporal (Thomas *et al.*, 2012). Ao lado disso, demonstrou-se maior prevalência de restrição de crescimento, anomalias faciais e anormalidades do Sistema Nervoso Central em crianças com exposição prenatal grave ao álcool do que em crianças não expostas (Kuehn *et al.*, 2012).

A restrição do crescimento é um dos desfechos adversos freqüentemente associado com a exposição pré-natal ao etanol (Haghighi Poodeh *et al.*, 2014; Patten *et al.*, 2013; Karnen-Ahola *et al.*, 2010) e característicos da FASD. Em relação ao efeito da exposição precoce a nicotina, estudos não observam alterações de peso da prole. Em estudo recente, nicotina foi administrada a ratas gestantes através de mini-bombas osmóticas implantadas a 6mg/kg/dia durante a gravidez inteira e não foram observadas diferenças nos pesos corporais da prole tardiamente (Li *et al.*, 2015). Em fêmeas grávidas, o consumo oral de nicotina não parece alterar o ganho de peso ou a ingestão de comida e nem alterar o ganho de peso dos filhotes pré ou pós-natalmente (Pauly *et al.*, 2004; Sparks e Pauly 1999). Examinados juntamente, nossos achados sustentam a suposição de que a diminuição da massa corporal em camundongos machos adolescentes observada no presente estudo e provocada pela exposição combinada as duas drogas, nicotina e etanol, tenham ocorrido pelo efeito do etanol, visto que não observamos diferenças significativas no peso dos animais expostos precocemente somente a nicotina.

4.4 Efeitos da exposição precoce a nicotina e/ou etanol e tratamento com vimpocetina/DMSO na atividade locomotora no Teste do Campo Aberto

Estudos clínicos examinaram a interação potencial entre tabagismo materno e consumo de álcool e observaram alterações maiores quando as drogas eram administradas conjuntamente (Shu et al., 1995; Haste et al., 1991). Em relação as consequências comportamentais a longo prazo causadas pela exposição a nicotina e ao etanol, um grupo de pesquisa sugeriu um efeito sinérgico sobre o aprendizado infantil (Martin et al., 1977, Streissguth et al., 1981) e estudos clínicos tem avaliado o possível papel do tabagismo materno em combinação com o consumo de álcool durante a gravidez em várias psicopatologias da infância, particularmente transtorno de hiperatividade com déficit de atenção (ADHD) (Hill et al., 2000; Mick et al., 2002).

Em modelos animais a exposição pré-natal à nicotina tem sido associada à hiperatividade (Ajarem e Ahmad, 1998; Fung e Lau, 1988). Ao lado disso, a hiperatividade após a exposição pré-natal ou neonatal ao etanol é um dos achados mais comumente relatados na literatura sobre os efeitos do etanol no desenvolvimento. Foi demonstrado que a exposição pré-natal ao etanol produz hiperatividade numa variedade de espécies incluindo macacos rhesus (Schneider et al., 2001), cobaias (Gibson et al., 2000, Catlin et al., 1993), ratos (Bond, 1988; Vorhees e Fernandez, 1986, Means et al., 1986, Ulug e Riley, 1983, Abel, 1982) e camundongos (Nunes et al., 2011; Mothes et al., 1996), bem como seres humanos que proporcionam suporte adicional à validade de modelos animais para estudo.

Neste estudo, embora a nicotina administrada durante o período que equivale a toda a gestação de humanos e o etanol durante o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação em humanos não tenham causado aumento significativo da atividade locomotora durante a adolescência, a exposição combinada a nicotina e ao etanol provocou hiperatividade locomotora. Gilbertson e Barron (2005) encontraram efeito semelhante quando administraram nicotina e etanol de PN1 a PN8. Este achado sugere que o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação de humanos é mais sensível a nicotina e etanol quando consideramos a hiperatividade como desfecho, contudo devemos levar em conta que no estudo de Gilbertson e Barron (2005), a dose de nicotina e a dose acumulada de etanol foram substancialmente maiores que aquelas utilizadas no nosso estudo. Além disso, aqui, identificamos a hiperatividade mesmo cerca de três semanas após o término da exposição através da avaliação da atividade, apesar de efeitos da exposição tenderem a se extinguir quando há grandes

intervalos entre a exposição e a avaliação do comportamento (Abel e Berman, 1994; Bond e Di Giusto, 1977; Driscoll et al., 1990; Dursun et al., 2006; Spohr et al., 2007; Tran et al., 2000).

4.5 Efeitos da exposição precoce a nicotina e/ou etanol no comportamento associado a ansiedade no Teste do Campo Aberto

A aversão dos animais ao centro do campo aberto tem sido interpretada dentro de uma perspectiva evolucionista (Palanza, 2001; Choleris *et al.*, 2001). Em geral, assume-se que os animais foram filogeneticamente moldados por seleção natural para exibir respostas de medo ou ansiedade a situações de risco potencial, como por exemplo, espaços abertos (Palanza, 2001; Choleris *et al.*, 2001). Comportamentos exploratórios no Teste do Campo Aberto, especialmente entradas no centro, estão associados à redução da ansiedade e essas medidas têm mostrado correlação negativa com medidas comportamentais e fisiológicas do medo em roedores (Archer, 1973). Normalmente, à medida que o roedor se habitua à arena do campo aberto, a ambulação no centro aumenta, indicando uma redução no medo e na emocionalidade, bem como a habituação ao novo ambiente (Walsh e Cummins, 1976). Este comportamento tem servido de base a diversos modelos animais de ansiedade (Palanza, 2001; Choleris et al., 2001). Vários trabalhos têm demonstrado que a administração de diversas drogas ansiolíticas ou tratamentos com ação ansiolítica aumentam o tempo de permanência no centro da arena (Ohta et al., 2010; Kumar et al., 2000). Neste estudo, em relação ao tempo no centro, encontramos uma diminuição quando comparamos os animais do grupo etanol com os do grupo controle, demonstrando um efeito ansiogênico do etanol. Isto sugere que a exposição ao etanol no período equivalente ao terceiro trimestre afeta o comportamento associado a ansiedade dos animais na adolescência. A exposição ao álcool durante o período fetal foi relatado por alguns autores para resultar em elevada ansiedade (Ogilvie e Rivier, 1997, Osborn et al., 1998, Weinberg et al., 1996). A doença mental e, em particular, os transtornos de depressão e ansiedade estão entre os problemas mais comumente relatados em crianças e adultos com FASD (Famy et al., 1998; Kodituwakku, 2007; O'Connor e Kasari, 2000, O'Connor et al., 2002, 2000, O'Connor e Paley, 2006, Roebuck et al., 1999, Streissguth et al., 2004). Adicionalmente, estudos apontam um aumento na ocorrência de distúrbios de ansiedade em humanos provocados pelo uso de álcool (Barr *et al.*, 2006), resultados semelhantes em relação aos níveis de ansiedade têm sido

observados em roedores (Schambra et al., 2016). Estudo recente também demonstrou efeito angiogênico do etanol em ratos testados no campo aberto (Motaghinejad et al, 2017).

Cabe notar ainda que embora a nicotina não tenha causado efeitos a longo prazo no comportamento associado a ansiedade, a exposição a nicotina inibe a expressão do efeito angiogênico do etanol na adolescência dos camundongos, o que sugere um efeito protetor da nicotina. Os mecanismos exatos que explicam as interações nicotina e etanol ainda precisam ser elucidados, entretanto, as ações da nicotina que parecem ter um papel mediador de seus efeitos neuroprotetores contra outras neurotoxinas, parecem estar relacionados com a ativação do fator de crescimento dos fibroblastos (Belluardo et al., 2000), a inativação dos canais de cálcio do tipo L (Stevens et al., 2003) e a diminuição da ativação da caspase 3 (Liu e Zhao, 2004). Ao lado disso, a nicotina pode prevenir a morte celular provocada por uma série de insultos neurotóxicos incluindo a excitotoxicidade, possivelmente pela modulação da sinalização de cálcio, o que pode alterar as respostas subsequentes a esse íon (Picciotto e Zoli, 2008). De fato, foi demonstrado que a nicotina inibe a neurotoxicidade induzida pelo etanol em células corticais e cerebelares cultivadas (Tizabi et al., 2003, 2004). 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).

4.6 Efeitos da exposição a nicotina e/ou etanol e do tratamento com vimpocetina/DMSO nas sessões T6 e T24, no Teste da Esquiva Passiva

Observamos que a exposição precoce ao etanol e/ou a nicotina foi capaz de provocar déficits de memória na sessão T6 no Teste da Esquiva Passiva, o que está de acordo com estudos anteriores que mostram danos de memória/aprendizado provocados por essas drogas.

A exposição à nicotina pré e pós-natal é conhecida por resultar em déficits de aprendizagem e memória. Por exemplo, em roedores, alguns estudos encontraram uma forte relação negativa entre a exposição à nicotina pré e pós-natal e o desempenho da memória espacial (Yanai et al, 1992; Sorenson et al, 1991; Martin et al, 1971). Da mesma forma, diversos relatos sobre crianças de mães fumantes tem demonstrado déficits na função executiva (Cornelius et al, 2001), habilidades linguísticas mais baixas (Fried et al, 1992) e QI mais baixos

(Milberger et al, 1998). Em estudo recente, observou-se uma associação entre nicotina pré e pós-natal e déficits cognitivos nas tarefas de memória no Teste da Esquiva Passiva (Balsevich et al, 2014). Os danos também são observados quando a exposição ocorre em outros momentos durante o desenvolvimento, como na adolescência. Abreu-Villaça e colaboradores encontraram efeitos negativos da exposição à nicotina durante a adolescência sobre a memória de curto prazo (Abreu-Villaça et al, 2007).

Em relação ao etanol observamos relatos semelhantes. Déficits de memória e aprendizado estão entre os principais distúrbios observados em humanos expostos ao etanol durante a gestação (Malisza *et al.* , 2005, Manji *et al.* , 2009, Rasmussen, 2005). Evidências indicam que crianças expostas ao etanol no período pré-natal apresentam deficiências em diferentes tipos de testes de memória, incluindo os que avaliam a memória de trabalho, de curto prazo e habituação (Kodituwakku *et al.* , 1995, Malisza *et al.*, 2005, Streissguth *et al.* , 1989, Uecker e Nadel, 1996). Apresentam também déficits em modalidades que envolvam memória verbal e visual (Manji *et al.*, 2009). Prejuízos na codificação e recuperação de informações na função executiva podem ser fatores que contribuem para esses déficits (Kully-Martens *et al.* , 2012). Crianças expostas ao álcool no período fetal apresentam prejuízos no aprendizado que podem ser avaliados através do desempenho acadêmico, tarefas matemáticas e de testes de QI relacionados ao nível ou ao tipo de exposição fetal ao álcool (Coles *et al.* , 1991). Diversos grupos de pesquisa vêm demonstrando que, em ratos e camundongos, aproximadamente as duas primeiras semanas de vida pós-natal são um período crítico para a manifestação de déficits neurocomportamentais causados pelo etanol como déficits de aprendizado e memória (Filgueiras *et al.*, 2010).

O comprometimento das memórias observado nesses estudos sugere um significativo impacto da nicotina e do etanol no desenvolvimento do hipocampo. Essa especulação é suportada pela literatura sobre a dependência do desempenho declarativo, explícito e espacial da memória no hipocampo (Berman e Hannigan, 2000). Aqui, os efeitos da exposição combinada as drogas, nicotina + etanol, foram de magnitude semelhante aos déficits causados pela exposição a nicotina ou ao etanol. Esse resultado é semelhante aos achados prévios que indicam que a co-administração de nicotina e etanol durante a adolescência resulta em pior desempenho de memória/aprendizagem (Abreu-Villaça et al., 2007). O mesmo também foi observado em resposta a administração combinada de fumaça de cigarro e etanol durante a adolescência (Abreu-Villaça et al., 2013).

Porém, os déficits observados não se mantêm. Na sessão T24, os danos provocados pela exposição precoce a nicotina não foram mantidos, somente a exposição ao etanol

isoladamente. Levando em consideração que a sessão T6 avalia a memória de curto prazo e a sessão T24 avalia a memória de longo prazo, nossos resultados sugerem que a exposição precoce a nicotina foi capaz de afetar a memória de curto prazo, mas, somente a exposição ao etanol foi capaz de afetar a memória de longo prazo. Nesse sentido, Izquierdo e colaboradores demonstraram que há mecanismos separados que medeiam a memória de curto e longo prazo (Izquierdo et al, 1998). Estudos eletrofisiológicos *in vitro* demonstraram que a exposição precoce ao etanol pode prejudicar a potenciação de longa duração (Richardson et al. , 2002, Sutherland et al. , 1997).

O tratamento com a vimpocetina foi capaz de reduzir todos os déficits observados nesse estudo e em ambas as sessões. Tem se demonstrado que a vimpocetina facilita a potencialização de longa duração aumenta a plasticidade, aumenta a complexidade das espinhas dendríticas (Lantz et al., 2012). Filgueiras e colaboradores demonstraram que o tratamento com vimpocetina, o mesmo inibidor da fosfodiesterase do tipo 1 usado em nosso estudo, reverteu déficits de aprendizado e memória em ratos expostos ao etanol no período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana (Filgueiras et al., 2010). Interessantemente, aqui observamos que nicotina e etanol, as quais tem ações primárias em alvos biológicos distintos, causam danos semelhantes na memória/aprendizado e que, a vimpocetina, reverte esses danos tanto quando as drogas são administradas em separado quanto combinadas. Isso sugere que , mesmo atuando por vias distintas, ambas as drogas acabam secundariamente afetando a cascata de sinalização do AMPc, e que essa cascata é mediadora dos danos de memória/aprendizado identificados. Adicionalmente, esses dados apontam para o potencial terapêutico da vimpocetina no tratamento de déficits cognitivos causados por exposição precoce a estas drogas.

4.7 Efeitos da exposição a nicotina e/ou etanol e do tratamento com vimpocetina/DMSO no Teste do Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi escolhido por ser um teste simples, rápido e que permite avaliar diferentes aspectos do processo de aprendizado e memória, como por exemplo, os mecanismos de curto e longo prazo (Dere *et al.*, 2007). Este teste se baseia na capacidade que os animais têm de reconhecer um objeto novo no ambiente. Ratos e

camundongos têm uma preferência inata por explorar objetos novos (Leger *et al.*, 2013). Desta forma, os animais que são capazes de reconhecer um objeto ao qual já foram previamente apresentados passarão mais tempo explorando o objeto novo (Leger *et al.*, 2013). Utilizamos a sessão 1, realizada uma hora e trinta minutos após o treino, para avaliar a memória de curto prazo e a sessão 2, realizada vinte e quatro horas após a sessão 1, para avaliar a memória de longo prazo. Observamos que a exposição precoce a nicotina e etanol separadamente provocaram prejuízos na memória de curto prazo, visto que na sessão 1 os animais expostos as drogas apresentaram um menor percentual de exploração no objeto novo (B) quando comparado ao objeto antigo (A1), já conhecido durante a sessão de treino. Porém, quando as drogas foram administradas juntas, não encontramos efeito significativo. Isto demonstra uma interação entre as drogas, onde quando juntas provocam um efeito protetor inibindo as alterações demonstradas quando administradas isoladamente. Em relação a memória de longo prazo não encontramos prejuízos significativos. A exposição à nicotina pré e pós-natal é conhecida por resultar em déficits de aprendizagem e memória. Estudo recente observou uma associação entre a exposição nicotina pré e pós-natal e déficits cognitivos nas tarefas de memória em camundongos do teste do Reconhecimento de Objetos e na Esquiva Passiva (Balsevichet *al.*, 2014). Uma série de estudos demonstram que a administração de duas injeções subcutâneas de 2,5 g/kg de etanol (intervalo entre as injeções de 2h) em PN8 promove um aumento marcante na morte neuronal por apoptose no neocórtex, hipocampo, corpos mamilares, núcleos anteriores do tálamo e núcleos da base (Ikonomidou *et al.*, 2000, Olney, 2002, Wozniak *et al.*, 2004). Este aumento na morte celular é usualmente associado com os prejuízos de memória e aprendizado apresentado por camundongos C57BL/6 adolescentes no teste do labirinto aquático de Morris (Wagner *et al.*, 2014, Wozniak *et al.*, 2004) e no teste de memória espacial (Sadrian *et al.*, 2014). A exposição ao etanol é capaz de promover danos no hipocampo como a redução no número de células (Gil-Mohapel *et al.*, 2010) e a redução da plasticidade (Zucca e Valenzuela, 2010). Estudos em humanos e outros primatas indicam que um dano limitado ao hipocampo é suficiente para promover um claro e consistente prejuízo no teste de reconhecimento de objetos (Squire *et al.*, 2007).

Observamos que o tratamento agudo com a vimpocetina foi capaz de restaurar a memória/aprendizado dos animais que receberam as drogas isoladamente, ou seja, o tratamento fez com ela que os animais aumentassem o percentual de exploração no objeto novo, em ambas as sessões, 1 e 2. Na sessão 2, observamos que a vimpocetina nas fêmeas dos grupos NIC, ETOH e NIC+ETOH, causou um aumento na interação com o objeto novo. O potencial da vimpocetina para melhorar a plasticidade neuronal, tem sido demonstrado usando múltiplos

paradigmas. A vimpocetina demonstrou facilitar a LTP (Molnar e Gaal, 1992, Molnar et al., 1994), melhorar a dinâmica estrutural das espinhas dendríticas (Lendvai et al., 2003), melhorar a recuperação da memória (DeNoble, 1987) e melhorar o desempenho em testes cognitivos em seres humanos (Hindmarch et al., 1991).

Efeitos da exposição a nicotina e etanol conjuntamente e do tratamento com vimpocetina/DMSO na quantificação do AMPc no córtex

O fato do tratamento com vimpocetina ser capaz de restaurar os níveis de AMPc no córtex dos animais expostos ao etanol está em acordo com estudos que sugerem que a via de sinalização regulada pelo AMPc desempenha um papel importante nos mecanismos de plasticidade neural. Na via de sinalização regulada pelo AMPc, a ativação da adenilato ciclase causada pela ligação da dopamina com os receptores D1 ou do glutamato com os receptores NMDA promove o aumento dos níveis de AMPc. O aumento dos níveis de AMPc leva a ativação de proteínas quinases, tais como a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que fosforilam o fator de transcrição CREB. A ativação do CREB leva a transcrição de uma série de genes relacionados à plasticidade (Frank e Greenberg, 1994; Medina e Krahe, 2008). Neste estudo, observamos que a exposição precoce ao etanol foi capaz de reduzir os níveis de AMPc no córtex, sendo que essa mesma diminuição foi identificada nos animais que foram expostos as duas drogas concomitantemente. O fato da exposição somente a nicotina não ter afetado a quantidade de AMPc demonstra que a diminuição observada no grupo que recebeu as duas drogas foi ocasionada pela exposição ao etanol. De particular interesse para esse estudo, vale mencionar que a exposição ao etanol durante o desenvolvimento é capaz de afetar vários elementos nesta via de sinalização. Particularmente, a exposição gestacional ao etanol reduz a densidade de receptores NMDA e diminui a capacidade de geração de LTPs no hipocampo de ratos com 45 dias de vida (Savage et al., 1992). A exposição gestacional ao álcool também promove uma redução no número de receptores D1 no sistema dopaminérgico mesolímbico de ratos adultos (Druse et al., 1990). De modo interessante, os distúrbios observados na linhagem de ratos SHR (spontaneous hypertensive rats), uma linhagem amplamente utilizada como modelo de TDAH, tem sido associados a defeitos na formação de AMPc (Russell, 2003). Além disso, a inibição da PKA no córtex pré-frontal de ratos produz déficits de atenção e hiperatividade locomotora (Paine et al., 2009).

4.9 Efeitos da exposição a nicotina e nicotina/etanol e do tratamento com vimpocetina/DMSO na quantificação do GMPc no hipocampo e no córtex

O GMPc é produzido pela enzima guanilato ciclase que é estimulada pelo óxido nítrico (NO). As vias de sinalização do NO estão amplamente envolvidas em processos de plasticidade sináptica e formação de memória (Schuman e Madison, 1991; Bredt e Snyder, 1992; Zhuo *et al.*, 1994; Arancio *et al.*, 1996; Son *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1999). A formação de GMPc pode levar a ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG está envolvida em processos como a localização de alvos sinápticos e a mobilização de vesículas sinápticas em células pré-sinápticas, levando a um aumento da liberação de neurotransmissores (Hawkins *et al.*, 1993; 1998) e ativação de cascatas de sinalização de proteínas kinases em células pós-sinápticas, causa, por sua vez, a ativação de transcrição e tradução, processos críticos para a plasticidade sináptica e a formação de memória (Lu *et al.*, 1999; Chien *et al.*, 2003). A PKG pode ativar o CREB diretamente, através de fosforilação que ocorre no mesmo sítio de fosforilação da PKA (Lu *et al.*, 1999), ou indiretamente pela via de MAP kinases. Neste caso, a PKG ativa a MEK que fosforila a ERK que, por sua vez, fosforila o CREB (Ota *et al.*, 2008). As MAP kinases são proteínas importantes para sinalização intracelular de tradução e desempenham um papel crítico na plasticidade neural e resposta inflamatória (Ji *et al.*, 2009). Estudos vêm demonstrando que as vias AMPc/PKA e GMPc/PKG podem participar de processos relacionados a plasticidade em diferentes etapas (Blokland *et al.*, 2006). É sabido que a exposição a drogas de abuso afeta a plasticidade neural causando déficits cognitivos. Neste estudo, observamos que a exposição a nicotina e nicotina+etanol reduziram os níveis de GMPc no córtex cerebral. No hipocampo, de forma semelhante, a nicotina isolada reduziu os níveis de GMPc, sendo que nesta região, essa redução foi intensificada quando da exposição combinada as duas drogas (nicotina+etanol). A intensificação da redução dos níveis de GMPc demonstra que o etanol em combinação com a nicotina foi capaz de acentuar os danos provocados pela mesma, o que não foi observado quando o etanol foi administrado isoladamente. Fedele e colaboradores (Fedele ET al, 1998), demonstraram que a nicotina via ativação de nAChRs aumenta e diminui a produção de cGMP no hipocampo de rato possivelmente através da estimulação de guanilil ciclase e antagonismo do receptor NMDA, respectivamente.

Em relação ao tratamento com a vimpocetina, a mesma foi capaz de aumentar os níveis de GMPc no córtex e hipocampo dos animais do grupo nicotina+etanol, mas não foi capaz de mitigar os efeitos identificados no grupo nicotina. Os efeitos deste inibidor têm sido atribuídos

a um aumento nos níveis de AMPc ou GMPc, os quais, por sua vez, podem ativar o fatores de transcrição como SRF e CREB levando à expressão de genes relacionados à plasticidade (Barad *et al.*, 1998; Blokland *et al.*, 2006; Medina, 2010).

4.10 Efeitos do tratamento com a vimpocetina/DMSO na quantificação do CREB e do pCREB no córtex

A proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca⁺⁺ (CREB) é regulada pela fosforilação em resposta a padrões de atividade neuronal (Deisseroth *et al.*, 2002) e o seu papel na plasticidade neuronal tem sido estabelecido há bastante tempo. Por exemplo, a função CREB é necessária para a consolidação da plasticidade duradoura, formação de memória e desenvolvimento de circuitos em vários sistemas neuronais (Finkbeiner *et al.*, 1997; Bito *et al.*, 1996; Deisseroth *et al.*, 1996; Frank *et al.*, 1994). Assim, a importância do CREB na regulação da função gênica e na integração de sinais fisiológicos torna-o um alvo molecular interessante para superar possíveis problemas causados pela exposição precoce ao álcool, bem como a outras drogas de abuso como a nicotina. Há evidências que mostram que a nicotina medeia diretamente a atividade de CREB. Em apoio, Hu e colaboradores, descobriram que a estimulação das células hipocâmpais pela nicotina aumenta a ativação de CREB. (Hu *et al.*, 2002). Curiosamente, Chang e Berg mostraram que enquanto a sinalização nicotínica ativa o CREB em neurônios de gânglios ciliares, isso acontece somente quando os canais dependentes de voltagem são bloqueados (Chang e Berg, *et al.*, 2001). Sugere-se que isso ocorra porque a nicotina sustenta a atividade de CREB através do influxo de cálcio. Estes resultados sugerem que a nicotina tem um impacto direto na cascata responsável pela mediação da atividade de CREB. Estudos sugerem que os inibidores da PDE podem ser bons candidatos para aumentar a ativação de CREB (Medina *et al.*, 2006; Barad *et al.*, 1998; Monti *et al.*, 2006). Esses inibidores impedem a decomposição de AMPc a 5'-AMP, prolongando a ativação de proteínas quinases que promovem a fosforilação de CREB (Bender *et al.*, 2006), que por sua vez pode melhorar a aprendizagem e a memória em indivíduos normais (Blokland *et al.*, 2006) e restabelecer a plasticidade da dominância ocular em um modelo animal de FASD (Medina *et al.*, 2006). Krahe e colaboradores, mostraram que a exposição precoce ao álcool leva a uma deficiência persistente na fosforilação de CREB e que o tratamento com um inibidor de fosfodiesterase do tipo 1, vários dias após o período de exposição ao álcool, restaura a fosforilação normal de

CREB (Medina et al, 2005; Medina et al, 2008). Consistente com os dados acima, em nosso trabalho, houve um aumento na expressão do CREB em resposta ao tratamento com vimpocetina. De forma similar, a vimpocetina provocou um aumento nos níveis de pCREB em todos os grupos, porém, o efeito foi mais intenso nos animais expostos a nicotina+etanol.

4.11 Associações entre as alterações neuroquímicas (AMPC, GMPc, CREB e pCREB) e os achados comportamentais

Em relação as alterações neuroquímicas, observamos que a exposição precoce ao etanol bem como ao etanol+nicotina foi capaz de reduzir os níveis de AMPc no córtex. Em relação ao GMPc, a nicotina e nicotina+etanol reduziram seus níveis no córtex e também no hipocampo, sendo que no hipocampo, a redução foi mais intensa no grupo nicotina+etanol. Esses achados sugerem que a exposição ao etanol é responsável pelos baixos níveis de AMPc, visto que a nicotina isoladamente não foi capaz de provocar redução somente em combinação com o etanol. Já com o GMPc foi diferente, a nicotina é a protagonista da redução, pois o etanol sozinho não reduziu os níveis de GMPc, somente na exposição combinada as duas drogas. Nossos achados estão de acordo com estudos em roedores, os quais sugerem que as deficiências na via de sinalização do AMPc contribuem para o fenótipo de hiperatividade em animais experimentais (Paine et al., 2009; Pascoli et al., 2005; Russell, 2003). Na cascata regulada por esse segundo mensageiro (Medina, 2011b), a ativação da adenilato ciclase pela ativação de receptores de dopamina, noradrenalina ou NMDA leva à geração de AMPc intracelular que, por sua vez, ativa cinases protéicas tais como a PKA. A PKA fosforila fatores de transcrição tais como CREB e SRF, conduzindo à expressão de genes que modulam a excitabilidade neuronal e a plasticidade em regiões cerebrais tais como o córtex frontal e o hipocampo (Goto e Grace, 2007, Gurden et al., 1999, 2000). A deleção de SRF em neurônios dopaminérgicos de camundongos provoca hiperatividade locomotora (Parkitna et al., 2010). Uma linhagem de ratos amplamente utilizada como modelo de TDAH, os animais SHR, tem sido associada a defeitos na formação de AMPc (Russell, 2003). Fedele e colaboradores demonstraram que a nicotina via ativação de nAChRs altera a produção de cGMP no hipocampo de rato. Essas reduções dos níveis dessas moléculas, AMPc/GMPc, parecem afetar os comportamentos avaliados nesse trabalho. Trabalhos vem sugerindo que distúrbios na plasticidade neural podem ser responsáveis por alterações comportamentais como a hiperatividade (Rapoport e Gogtay, 2008; Jensen *et al.*, 2009; Heath

e Picciotto, 2009). A inibição da PKA no córtex pré-frontal de ratos produz déficits de atenção e hiperatividade locomotora que pode ser útil como modelo animal para o TDAH (Paine et al., 2009). De fato, alguns estudos tem demonstrado que a cascata de sinalização envolvendo o segundo mensageiro AMPc, a AMPc/Ca⁺⁺ e o CREB são importantes para diversos processos relacionados a plasticidade neuronal como a dominância ocular (Mower et al., 2002; Beaver et al., 2001; Pham et al., 1999), o LTP e o aprendizado e a memória (Frank e Greenberg, 1994; Finkbeiner et al., 1997; Lamprecht, 1999). Adicionalmente, estudos têm demonstrado que a via de sinalização envolvendo GMPc pode promover plasticidade sináptica e consolidação da memória, em parte pela ativação da cascata de sinalização MEK/ERK/CREB (Atkins et al., 1998; Schafe et al., 2000; Josselyn et al., 2001). Aqui, embora a nicotina administrada durante o período que equivale a toda a gestação de humanos e o etanol durante o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação em humanos não tenham causado aumento significativo da atividade locomotora durante a adolescência, a exposição combinada a nicotina e ao etanol provocou hiperatividade locomotora no período da adolescência. Em relação aos testes que avaliaram a memória, na Esquiva Passiva observamos que a exposição precoce a nicotina, ao etanol e a combinação entre estas duas drogas foi capaz de afetar a memória de curto prazo, mas, somente a exposição ao etanol foi capaz de afetar a memória de longo prazo. No teste do Reconhecimento de Objetos, observamos que a exposição precoce a nicotina e etanol separadamente provocaram prejuízos na memória de curto prazo. Estes resultados sugerem que as alterações nos níveis de AMPc e GMPc estão associadas as alterações comportamentais identificadas.

As PDE são enzimas que regulam os níveis celulares de segundos mensageiros AMPc e GMPc, controlando suas taxas de degradação. Estudos têm demonstrado que os inibidores da PDE, dentre eles destaca-se a vimpocetina, um inibidor não específico da PDE1 (Medina, 2010), melhoram processos relacionados à neuroplasticidade como a memória e o aprendizado em diversas espécies (Blokland et al., 2006; Bourtchouladze et al., 2003; Goodlett e Peterson, 1995). Aqui observamos que a vimpocetina foi capaz de restaurar os níveis de AMP no córtex. Vimpocetina foi capaz também de aumentar as quantidades de GMPc no córtex e hipocampo. Demonstramos que o tratamento agudo com a vimpocetina foi capaz de restaurar a memória/aprendizado no Teste de Reconhecimento de Objetos, dos animais que receberam as drogas isoladamente. Em relação ao Teste da Esquiva Passiva que também avalia a memória, a vimpocetina foi capaz de reduzir os déficits provocados pela exposição as drogas isoladas ou conjuntamente, na sessão que analisa a memória de curto prazo. Em relação a outra sessão que avalia a memória de longo prazo, a vimpocetina foi capaz de reduzir os déficits provocados

pela exposição somente ao etanol. Adicionalmente, em relação ao teste que avaliou a atividade locomotora, o tratamento com vimpocetina também foi capaz de gerar benefícios. O grupo que recebeu vimpocetina teve redução da hiperatividade causada pelo etanol em combinação com a nicotina até os níveis do grupo controle. Estes achados sugerem que a vimpocetina atua ativando ambas as cascatas de AMPc e GMPc as quais, por sua vez atuam recuperando os prejuízos induzidos pelas drogas nos testes comportamentais.

O aumento nos níveis de AMPc e GMPc por sua vez, podem ativar o fatores de transcrição como o CREB. O CREB é uma das moléculas mais importantes nos processos de plasticidade neuronal e é crucial para vários paradigmas, como a LTP (Barco et al., 2002; Bourtchouladze et al., 2003), aprendizagem e memória (Frank e Greenberg, 1994; Silva et al., 1998; Lamprecht, 2005). Em nosso trabalho, houve um aumento na expressão do CREB e pCREB em resposta ao tratamento com vimpocetina. Estudos sugerem que os inibidores da PDE podem ser bons candidatos para aumentar a ativação de CREB (Medina et al, 2006; Barad et al, 1998; Monti et al, 2006). Como descrito anteriormente, esses inibidores impedem a decomposição de AMPc a 5'-AMP, prolongando a ativação de proteínas quinases que promovem a fosforilação de CREB (Bender et al, 2006). Apesar de não termos encontrado uma redução significativa de CREB e pCREB provocada pela exposição as drogas, acreditamos que o aumento dos seus níveis foram devido ao tratamento agudo com a vimpocetina e que este aumento possa ser responsável pelas melhoras observadas nos testes comportamentais. Com o uso agudo da vimpocetina observamos aumento nos níveis de AMPc e GMPc, os quais, por sua vez, podem ativar o fatores de transcrição como CREB levando à expressão de genes relacionados à plasticidade. Embora a ativação de CREB pareça ser necessária para a formação normal da memória a longo prazo, há também evidências que sugerem que a fosforilação de CREB é necessária para os efeitos da nicotina na aprendizagem dependente do hipocampo. Kenney e colaboradores mostraram que a nicotina e o aprendizado interagem para aumentar a ligação de CREB fosforilada no hipocampo, mas a administração de nicotina sozinha ou a aprendizagem sozinha não tem efeito (Kenney, et al, 2012). Além disso, a ativação do CREB em resposta a vimpocetina é capaz de restaurar a plasticidade neuronal no córtex visual de furões, a qual foi comprometida pela exposição precoce ao etanol (Krahe et al., 2009). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a activação de CREB desempenha um papel crucial nos efeitos da nicotina e do etanol na atividade dos animais e na aprendizagem dependente do hipocampo.

CONCLUSÕES

Neste estudo, observamos que a exposição precoce e concomitante a nicotina e ao etanol foi responsável por causar hiperatividade locomotora nos animais adolescentes. Em relação a memória/aprendizado, a exposição a nicotina e/ou etanol provocaram déficits principalmente na memória de curto prazo. Quanto as alterações neuroquímicas, a exposição ao etanol e etanol+nicotina durante o período perinatal foi capaz de reduzir os níveis de AMPc cortical no período da adolescência. Quanto ao GMPc, a redução foi evidente no córtex cerebral e hipocampo dos animais expostos a nicotina e nicotina+etanol.

O tratamento agudo com vimpocetina foi eficiente em mitigar os efeitos das drogas de abuso. A vimpocetina reduziu a hiperatividade identificada no grupo exposto a nicotina combinada com etanol. A vimpocetina também foi eficaz em reduzir os déficits de memória/aprendizado nos grupos previamente expostos as drogas de abuso durante o desenvolvimento. Interessantemente, apesar dos efeitos do etanol e da nicotina em separado, o tratamento agudo dos animais adolescentes com vimpocetina reverteu a redução nos níveis de AMPc e GMPc somente nos animais previamente expostos a combinação entre as duas drogas de abuso. De forma semelhante o aumento dos níveis de pCREB foram mais intensos no grupo previamente exposto a nicotina+etanol.

Pelos nossos achados, sugerimos que o potencial dos inibidores de PDE, particularmente importante para este trabalho, a vimpocetina, restaura danos comportamentais provocados pela exposição a nicotina, durante todo o período gestacional, e etanol, durante o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação em humanos, em parte através do aumento dos níveis de AMPc/GMPc no sistema nervoso central e como consequência desse aumento, do aumento das quantidade de CREB e pCREB. Desta forma, o tratamento com vimpocetina aparece como uma nova perspectiva para novas abordagens de pesquisa e tratamento de alterações comportamentais decorrentes do consumo de nicotina e etanol durante o período gestacional.

REFERÊNCIAS

- Abel EL, Berman RF. Long-term behavioral effects of prenatal alcohol exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol* 1994;16:467–70.
- Abreu-Villaça Y, de Carvalho Graça AC, Ribeiro-Carvalho A, Naiff Vde F, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nicotine Tob Res.* 2013 Jul;15(7):1211-21. doi: 10.1093/ntr/nts250. Epub 2012 Dec 10.
- Abreu-Villaça Y1, Medeiros AH, Lima CS, Faria FP, Filgueiras CC, Manhães AC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. *Behav Brain Res.* 2007 Jul 19;181(1):136-46. Epub 2007 Apr 5.
- Abreu-Villaça Y1, Nunes F, do E Queiroz-Gomes F, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Feb;33(3):599-610. Epub 2007 Apr 25.
- Acheson SK, Ross EL, Swartzwelder HS. Age-independent and dose-response effects of ethanol on spatial memory in rats. *Alcohol.* 23: 167-175, 2001.
- Adam T, Mitschke S, Streibel T, Baker RR, Zimmermann R. Quantitative Puff-by-Puff-Resolved Characterization of Selected Toxic Compounds in Cigarette Mainstream Smoke. *Chem. Res. Toxicol.* 2006; 19, 511-520.
- Adnams CM, Kodituwakku PW, Hay A, Molteno CD, Viljoen D, May PA. Patterns of cognitive-motor development in children with fetal alcohol syndrome from a community in South Africa. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25:557-62.
- Adriani W, Granstrem O, Macri S, Izykenova G, Dambinova S, Laviola G. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:869–78.
- Adriani W, Macri S, Pacifici R, Laviola G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology* 2002;27:212–24.
- Altman J1, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol.* 1990 Nov 15;301(3):365-81.
- Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell,* 1996; 87: 1025-35.
- Araújo JA, Menezes AMB, et al. Diretrizes para Cessação do Tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004; 30 (Supl 2).

Astley SJ, Magnuson SI, Omnel LM, Clarren SK. Fetal alcohol syndrome: changes in craniofacial form with age, cognition, and timing of ethanol exposure in the macaque. *Teratology*, 1999; 59: 163-172.

Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience*, 1998; 1: 602-609.

Balachova T, Bonner B, Chaffin M, Bard D, Isurina G, Tsvetkova L, et al. Women's alcohol consumption and risk for alcohol-exposed pregnancies in Russia. *Addiction*. 2012;107:109-17.

Balbani APS, Montovani JC. Methods for smoking cessation and treatment of nicotine dependence. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2005; V.71, n.6, 820-7, nov./dez.

Balsevich G, Poon A, Goldowitz D, Wilking JA. The effects of pre- and post-natal nicotine exposure and genetic background on the striatum and behavioral phenotypes in the mouse. *Behav Brain Res*. 2014 Jun 1;266:7-18. doi: 10.1016/j.bbr.2014.02.038. Epub 2014 Mar 4.

Banakar MK, Kudlur NS, George S. Fetal alcohol spectrum disorder (FASD). *Indian Journal of Pediatrics*, 2009; 76: 1173-1175.

Barad M, Bourtchouladze R, Winder DG, Golan H, Kandel E (1998) Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15020–15025.

Barbier E, Houchi H, Warnault V, Pierrefiche O, Daoust M, Naassila M. Effects of prenatal and postnatal maternal ethanol on offspring response to alcohol and psychostimulants in long evans rats. *Neuroscience*. 161(2):427-40, 2009.

Barco, A., Alaarcon, J. M., and Kandel, E. (2002). Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 35, 345–353.

Barneda-Zahonero B, Servitja JM, Badiola N, Minano-Molina AJ, Fado R, Saura CA, et al. *Nurr1* is required for NMDA receptor-mediated neuronal survival. *JBiolChem*. 2012;no prelo.

Barr AM, Hofmann CE, Phillips AG, Weinberg J, Honer WG. Prenatal ethanol exposure in rats decreases levels of complexin proteins in the frontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2005; 29: 1915-20.

Barros AJD, Santos IS, Victoria CG, Albernaz EP, Domingues MR, Timm IK, et al. Coorte de nascimentos de Pelotas, 2004: metodologia e descrição. *Rev Saúde Pública*. 2006; 40(3):402-13.

Basta PV1, Basham KB, Ross WP, Brust ME, Navarro HA. Gestational nicotine exposure alone or in combination with ethanol down-modulates offspring immune function. *Int J Immunopharmacol*. 2000 Feb;22(2):159-69.

Batel P1, Pessione F, Maître C, Rueff B. Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction*. 1995 Jul;90(7):977-80.

Batstra L, Hadders-Algra M, Neeleman J. Effect of antenatal exposure to maternal smoking on behavioural problems and academic achievement in childhood: prospective evidence from a Dutch birth cohort. *Early Hum Dev.* 2003 Dec;75(12):21-33.

Bau Chd. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. *Ciência & Saúde Coletiva*; 2002; 183-190.

Bauer-Moffett C, Altman J. The effect of ethanol chronically administered to preweanling rats on cerebellar development: a morphological study. *Brain Research*, 1977; 119: 249-268.

Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*. 14:83–144, 1993.

Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*. 1982 May 21;216(4548):890-2.

Bayer SA. 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res*. 1983;50(2-3):329-40.

Beaver CJ, Ji Q, Fischer QS, Daw NW. Cyclic AMP-dependent protein kinase mediates ocular dominance shifts in cat visual cortex. *Nature Neuroscience*, 2001; 4:159-163.

Belluardo N, Mudo G, Blum M, Fuxe K (2000) Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav Brain Res* 113:21-34.

Bender AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58: 488–520.

Benowitz NL. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med. Clin. North Am.* 1992; 76: 415-437.

Benowitz, NL. Nicotine safety and toxicity. Ed Oxford Univ Press New York. 1998.

Berman RF, Hannigan JH. Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. *Hippocampus*. 2000;10:94-110.

Bien TH1, Burge R. Smoking and drinking: a review of the literature. *Int J Addict*. 1990 Dec;25(12):1429-54.

Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: A Ca⁺⁺ and stimulus duration dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87: 1203–1214.

Blokland A, Schreiber R, Prickaerts J (2006) Improving memory: a role for phosphodiesterases. *Curr Pharm Des* 12: 2511–2523.

Bond NW, Di Giusto EL. Prenatal alcohol consumption and open-field behaviour in rats: effects of age at time of testing. *Psychopharmacology (Berl)* 1977;52:311–2.

Bourtchouladze, R., Lidge, R., Catapano, R., Stanley, J., Gossweiler, S., Romashko, D., Scott, R., and Tully, T. (2003). A mouse model of Rubinstein–Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10518–10522.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992; 8: 3-11.

Broide RS, O'Connor LT, Smith MA, Smith JA, Leslie FM. Developmental expression of alpha 7 neuronal nicotinic receptor messenger RNA in rat sensory cortex and thalamus. *Neuroscience*. 1995 Jul;67(1):83-94.

Buisson B, Bertrand D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends in pharmacological sciences*; 2002; 23:130-6.

Burd L, Klug MG, Martsof JT and Kerbeshian J. Fetal alcohol syndrome: neuropsychiatric phenomics. *Neurotoxicol Teratol.*, 2003; 25: 697-705.

Burden MJ, Jacobson SW, Sokol RJ, Jacobson JL. Effects of prenatal alcohol exposure on attention and working memory at 7.5 years of age, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 2005; 29:443-452.

Button TM, Maughan B, McGuffin P. The relationship of maternal smoking to psychological problems in the offspring. *Early Hum Dev.* 83: 727–732, 2007.

Caravaggi AM, Sardi A, Baldoli GF, De Francesco CF, Luca C. Hemodynamic profile of a new cerebral vasodilator, vincamine and of one of its derivatives, apovincaminic acid ethylester (RGH-4405). *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 1977; 226: 139-48.

Carmody TP, Brischetto CS, Matarazzo JD, O'Donnell RP, Connor WE. Co-occurrent use of cigarettes, alcohol, and coffee in healthy, community-living men and women. *Health Psychol*, 1985; 4: 323-335.

Çelik T, Çakir E, Kayir H, Bilgi C, Uzbay T. The effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on passive avoidance task and serum cholinesterase level in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005; 29: 505-509.

Centers for Disease C, Prevention CDC. Alcohol use among pregnant and nonpregnant women of childbearing age - United States, 1991-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58:529-32.

Centers for Disease Control and Prevention Annual smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and economic costs-United States, 1995-1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2002. Rpt . 51.

Cesconetto PA, Andrade CM, Cattani D, Domingues JT, Parisotto EB, Filho DW, Zamoner A. Maternal Exposure to Ethanol During Pregnancy and Lactation Affects Glutamatergic System and Induces Oxidative Stress in Offspring Hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016 Jan;40(1):52-61. doi: 10.1111/acer.12917.

Chang, K.T. and D.K. Berg, Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron*, 2001. 32(5): p. 855-865. 202

Changeux JP, Danchin A. Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature*, 1976; 264: 705-712.

Chen WJ, Maier SE, Parnell SE, West JR. Alcohol and the developing brain: neuroanatomical studies *Alcohol Research & Health*, 2003; 27: 174-180.

Cheung WY. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Evidence for and properties of a protein activator. *The Journal of Biological Chemistry*, 1970; 246:2859-2869.

Chiodo LM, Da Costa De, Hannigan JH, Covington CY, Sokol RJ, Janisse J, Greenwald M, AGER J, Delaney-black V. The impact of maternal age on the effects of prenatal alcohol exposure on attention. *Acoholism: Clinical and Experimental Research*, 2010.

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

Christensen MH1, Nielsen ML1, Kohlmeier KA. Electrophysiological changes in laterodorsal tegmental neurons associated with prenatal nicotine exposure: implications for heightened susceptibility to addict to drugs of abuse. *J Dev Orig Health Dis*. 2015 Jun;6(3):182-200. doi: 10.1017/S204017441400049X. Epub 2014 Oct 23.

Coles CD, Brown RT, Smith IE, Platzman KA, Erickson S, Falek A. Effects of prenatal alcohol exposure at school age. I. Physical and cognitive development *Neurotoxicology and Teratology*, 1991; 13: 357-367.

Connor PD, Sampson PD, Streissguth AP, Bookstein FL, Barr HM. Effects of prenatal alcohol exposure on fine motor coordination and balance: A study of two adult samples. *Neuropsychologia*. 2006;44:744-51.

Cook RT, Keiner JA, Yen A. Ethanol causes accelerated G1 arrest in differentiating HL-60 cells. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1990; 14: 695-703.

Cornelius MD, Day NL. The effects of tobacco use during and after pregnancy on exposed children. *Alcohol Res Health* 2000; 24: 242-9.

Cornelius MD, Ryan CM, Day NL, Goldschmidt L, Willford JA. Prenatal tobacco effects on neuropsychological outcomes among preadolescents. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* 2001;22(4):217-25.

Cornelius MD1, Goldschmidt L, DeGenna N, Day NL. Smoking during teenage pregnancies: effects on behavioral problems in offspring. *Nicotine Tob Res*. 2007 Jul;9(7):739-50.

Crair MC, Malenka RC. A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature*, 1995; 375: 325-328.

Crair MC. Neuronal activity during development: permissive or instructive? *Current Opinion in Neurobiology*, 1999; 9: 88-93.

Cudd TA. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *ExpBiolMed(Maywood)*. 2005;230:389-93.

- Dani JA, Heinemann S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse.. *Neuron* 16: 1996; 905-908.
- Dani JA1, Harris RA. Nicotine addiction and comorbidity with alcohol abuse and mental illness. *Nat Neurosci.* 2005 Nov;8(11):1465-70.
- Deisseroth K, Bito H, Tsien RW (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16: 89–101.
- Deisseroth K, Tsien RW (2002) Dynamic multiphosphorylation passwords for activity-dependent gene expression. *Neuron* 34: 179–182.
- Deng XS, Deitrich RA. Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Curr Drug Abuse Rev.*, 2008; 1:3-8.
- DeNoble, V.J., 1987. Vinpocetine enhances retrieval of a step-through passive avoidance response in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 26, 183–186.
- Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *NeurosciBiobehavRev.* 2007;31:673-704.
- DIAZ J, SAMSON HH. Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. *Science*, 1980; 208: 751-3.
- Dickson PA et al. Effects of variation at the ALDH2 locus on alcohol metabolism, sensitivity, consumption, and dependence in Europeans. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2006; 30: 1093–1100.
- Dickson PE, Miller MM, Rogers TD, Blaha CD, Mittleman G. Effects of adolescent nicotine exposure and withdrawal on intravenous cocaine self-administration during adulthood in male C57BL/6J mice. *Addict Biol.* 2014 Jan;19(1):37-48.
- Dierker L, Lloyd-Richardson E, Stolar M, Flay B, Tiffany S, Collins L, Bailey S, Nichter M, Nichter M, Clayton R; Tobacco Etiology Research Network (TERN). The proximal association between smoking and alcohol use among first year college students. *Drug Alcohol Depend.* 2006 Jan 4;8.
- DiFranza JR, Guerrera MP. Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol*, 1990; 51: 130-135.
- Dinas PC, Koutedakis Y; Flouris AD. Effects of active and passive tobacco cigarette smoking on heart rate variability. *Internacional Journal Of Cardiology.* 2011.
- Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum.Dev.* 3: 79-83, 1979.
- Driscoll CD, Streissguth AP, Riley EP. Prenatal alcohol exposure: comparability of effects in humans and animal models. *Neurotoxicol Teratol* 1990;12:231–7
- Druse MJ, Tajuddin N, Kuo A, Connerty M. Effects of in utero ethanol exposure on the developing dopaminergic system in rats. *J Neurosci. Res.*, 1990; 27:233-240.

Duranceaux NC et al. Associations of variations in alcohol dehydrogenase genes with the level of response to alcohol in non-Asians. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2006; 30: 1470–1478.

Dursun I, Jakubowska-Dogru E, Uzbay T. Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85:345–55.

Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine and Brain Development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 84(1):30-44, 2008.

England LJ, Grauman A, Qian C, Wilkins DG, Schisterman EF, Yu KF, Levine RJ. Misclassification of maternal smoking status and its effects on an epidemiologic study of pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res.* 9: 1005-1013, 2007

Falk de, Yi hy, Hiller-Sturmhöfel s. An epidemiologic analysis of co-occurring alcohol and tobacco use and disorders. *Alcohol Research & Health*, 2006; 29(3): 162-171.

Fedele E, Varnier G, Ansaldo M.A., Raiteri M, Nicotine administration stimulates the in vivo N-methyl-d-aspartate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat hippocampus through glutamate release, *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 1042–1048.

Ferguson, B. B., Wilson, D. V., Schaffer, W. Determination of nicotine concentration in human milk. *Am J Dis Child.* 130:837. 1976.

File SE, Cheeta S, Irvine EE, Tucci S, Akthar M. Conditioned anxiety to nicotine. *Psychopharmacology* 2002; 164: 309-17.

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

Filgueiras CC, Krahe TE, Medina AE. Phosphodiesterase type 1 inhibition improves learning in rats exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation. *Neurosci Lett.* 2010 Apr 12;473(3):202-7. doi: 10.1016/j.neulet.2010.02.046. Epub 2010 Feb 26.

Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, et al. (1997) CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19: 1031–1047.

Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, Gonzalez-Castaneda RE, Beas-Zarate C. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurologia.* 2012.

Frank DA and Greenberg ME (1994) CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* 79:5-8.

Franke RM, Park M, Belluzzi JD, Leslie FM: Prenatal nicotine exposure changes natural and drug-induced reinforcement in adolescent male rats. *Eur J Neurosci* 2008;27:2952– 2961.

Fried PA, Connell CMO, Watkinson B. 60- and 72-month follow-up of children prenatally exposed to marijuana, cigarettes, and alcohol: cognitive and language assessment. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* 1992;13:383–91.

Funk D, Marinelli PW, Lê AD. Biological processes underlying co-use of alcohol and nicotine: neuronal mechanisms, cross-tolerance, and genetic factors. *Alcohol Res Health*. 2006;29(3):186-92.

Gaddnas H, Pietila K, Ahtee L. Effects of chronic oral nicotine treatment and its withdrawal on locomotor activity and brain monoamines in mice. *Behav Brain Res* 2000:113.

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

Galão AO, Soder AS, Gerhardt M, Faertes TH, Krüger MS, Pereira DF, et al. Efeitos do fumo materno durante a gestação e complicações perinatais. *Rev HCPA*. 2009; 29(3):218-24.

Gambrill AC, Barria A. NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:5855-60.

Gilbertson RJ1, Barron S. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005 May;81(1):54-64. Epub 2005 Apr 19.

Gilliland FD, Li YF, Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Feb;163(2):429-36.

Gil-Mohapel J, Boehme F, Kainer L, Christie BR. Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: insights from different rodent models. *Brain Res Rev*. 2010;64:283-303.

Givens B, McMahon K. Effects of ethanol on nonspatial working memory and attention in rats. *Behav Neurosci*, 1997; 111: 275-282.

Givens B. Effect of ethanol on sustained attention in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997; 129: 135-140.

Glazewski, S., Barth, A. L., Wallace, H., McKenna, M., Silva, A., and Fox, K. (1999). Impaired experience-dependent plasticity in barrel cortex of mice lacking the alpha and delta isoforms of CREB. *Cereb. Cortex* 9, 249-256.

Good CH, Bay KD, Buchanan RA, McKeon KA, Skinner RD, Garcia-Rill E. Prenatal exposure to cigarette smoke affects the physiology of pedunculopontine nucleus (PPN) neurons in development. *Neurotoxicol Teratol*. 2006; 28, 210-219.

Good CH1, Bay KD, Buchanan RA, McKeon KA, Skinner RD, Garcia-Rill E. Prenatal exposure to cigarette smoke affects the physiology of pedunculopontine nucleus (PPN) neurons in development. *Neurotoxicol Teratol*. 2006 Mar-Apr;28(2):210-9. Epub 2006 Feb 15.

Goodlett CR, Horn KH. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res Health*. 2001;25:175-84.

Goodlett CR, Marcussen BL, West JR. A single day of alcohol exposure during the brain growth spurt induces brain weight restriction and cerebellar Purkinje cell loss. *Alcohol*, 1990; 7: 107-114.

Goodlett CR1, Peterson SD. Sex differences in vulnerability to developmental spatial learning deficits induced by limited binge alcohol exposure in neonatal rats. *Neurobiol Learn Mem*. 1995 Nov;64(3):265-75.

Goto, Y., Grace, A.A., 2007. The dopamine system and the pathophysiology of schizophrenia: a basic science perspective. *Int. Rev. Neurobiol.* 78, 41–68.

Grant BF1, Hasin DS, Chou SP, Stinson FS, Dawson DA. Nicotine dependence and psychiatric disorders in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Nov;61(11):1107-15.

Gritz ER, Dresler C, Sarna L. Smoking, the missing drug interaction in clinical trials: ignoring the obvious. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2287-93.

Guerri C, Bazinet A, Riley EP. Fetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behavior. *Alcohol*. 44(2):108-14. 2009.

Gurden, H., Takita, M., Jay, T.M., 2000. Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. *J. Neurosci.* 20, RC106.

Gurden, H., Tassin, J.P., Jay, T.M., 1999. Integrity of the mesocortical dopaminergic system is necessary for complete expression of in vivo hippocampal-prefrontal cortex long-term potentiation. *Neuroscience* 94, 1019–1027.

Haghighi Poodeh S, Alhonen L, Salonurmi T, Savolainen MJ (2014) Ethanol-induced impairment of polyamine homeostasis – a potential cause of neural tube defect and intrauterine growth restriction in fetal alcohol syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 446:173–178

Hannigan JH Armant DR. Alcohol in pregnancy and neonatal outcome. *Semin.Neonatol.* 5: 243-254, 2000.

Hannigan JH, Berman RF. Amelioration of fetal alcohol-related neurodevelopmental disorders in rats: exploring pharmacological and environmental treatments. *Neurotoxicology and Teratology*, 2000; 22: 103-111.

Hannigan JH, O'leary-moore SK, Berman RF. Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 2007; 31: 202-211.

Harris SR, MacKay LL, Osborn JA. Autistic behaviors in offspring of mothers abusing alcohol and other drugs: a series of case reports. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 19: 660-665, 1995.

Harrod SB, Lacy RT, Zhu J, Hughes BA, Perna MK, Brown RW: Gestational IV nicotine produces elevated brain-derived neurotrophic factor in the mesocorticolimbic dopamine system of adolescent rat offspring. *Synapse* 2011;65:1382–1392.

Haste FM1, Anderson HR, Brooke OG, Bland JM, Peacock JL. The effects of smoking and drinking on the anthropometric measurements of neonates. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1991 Jan;5(1):83-92.

Hatcher, R. A., Grusby, H. The elimination of nicotine in the milk. *J Pharmacol Exp Therap.* 32:1. 1927.

Hawkins RD, Kandel ER, Siegelbaum SA. Learning to modulate transmitter release: themes and variations in synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.*, 1993; 16: 625-65.

Hawkins RD, Son H, Arancio O. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res.*, 1998; 118: 155-72.

Heath CJ, Picciotto MR. Nicotine-induced plasticity during development: modulation of the cholinergic system and long-term consequences for circuits involved in attention and sensory processing. *Neuropharmacology*, 2009; 56: 254-262.

Hebb Do (1949). *The organization of behavior: A neuropsychological theory.* Wiley: New York.

Henle F, Dehmel M, Leemhuis J, Fischer C, Meyer DK. Role of GluN2A and GluN2B subunits in the formation of filopodia and secondary dendrites in cultured hippocampal neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012;385:171-80.

HILL SY et al. Factors predicting the onset of adolescent drinking in families at high risk for developing alcoholism. *Biological Psychiatry*, 48: 265–275, 2000.

Hindmarch,I., Fuchs, H.H., Erzigkeit, H., 1991. Efficacy and tolerance of vinpocetine in ambulant patients suffering from mild to moderate organic psychosyndromes. *International Clinical Psychopharmacology* 6, 31–43.

Hintz T1, Mann K. Long-term behavior in treated alcoholism: Evidence for beneficial carry-over effects of abstinence from smoking on alcohol use and vice versa. *Addict Behav.* 2007 Dec;32(12):3093-100. Epub 2007 Jun 9.

Hu M1, Liu QS, Chang KT, Berg DK. Nicotinic regulation of CREB activation in hippocampal neurons by glutamatergic and nonglutamatergic pathways. *Mol Cell Neurosci.* 2002 Dec;21(4):616-25.

Hu, M., et al., Nicotinic regulation of CREB activation in hippocampal neurons by glutamatergic and nonglutamatergic pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2002. 21(4): p. 616-625.

Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain. A review. *Alcohol*, 1996; 13: 147–151.

Huttenlocher PR1. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia.* 1990;28(6):517-27.

Ieraci A, Herrera DG. Nicotinamide protects against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain. *PLoS Med.* 2006;3 e101:547-57.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Hörster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 2000; 287: 1056-1060.

Ikonomidou C. Triggers of apoptosis in the immature brain. *Brain Dev.* 2009;31:488-92.

Istvan J, Matarazzo JD. Tobacco, alcohol, and caffeine use: a review of their interrelationships. *Psychol Bull.* 1984 Mar;95(2):301-26.

Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393, 635–636. doi:10.1038/31371

Jaddoe VW, Troe EJ, Hofman A, Mackenbach JP, Moll HA, Steegers EA, Witteman JC. Active and passive maternal smoking during pregnancy and the risks of low birthweight and preterm birth: the Generation R Study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2008 Mar;22(2):162-71.

Jain KK. Modulators of nicotinic acetylcholine receptors as analgesics.. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5: 76-81.

Jensen V, Rinholm JE, Johansen TJ, Medin T, Storm-mathisen J, Sagvolden T, HVALBY O, Bergersen LH. N-methyl-D-aspartate receptor subunit dysfunction at hippocampal glutamatergic synapses in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuroscience*, 2009; 158: 353-364.

Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev.*, 2009; 60: 135-48.

Jindal SK, Gupta D. The relationship between tobacco smoke & bronchial asthma. *Indian J Med Res* 2004; 120: 443-53.

Josselyn SA, Shi C, Carlezon WA JR, Neve RL, Nestler EJ, Davis M. Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdale. *The Journal of Neuroscience*, 2001; 21: 2404-2412.

Josselyn, S. A., and Nguyen, P. V. (2005). CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Curr. Drug. Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 481–497.

Kakkar R, Raju RV, Sharma RK. Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1). *Cellular and Molecular Life Science*, 1999; 55: 1164-1186.

Kaminen-Ahola N, Ahola A, Flatscher-Bader T, Wilkins SJ, Anderson GJ, Whitelaw E, Chong S (2010) Postnatal growth restriction and gene expression changes in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:818–826

Kandel ER, Schwartz h, Jessell TM (2000). *Principles of Neuroscience*. Elsevier: New York.

Kaplan-Estrin M, Jacobson SW, Jacobson JL. Neurobehavioral effects of prenatal alcohol exposure at 26 months. *Neurotoxicol Teratol.* 1999;21:503-11.

Karaçay B, Li S, Bonthius DJ. Maturation-dependent alcohol resistance in the developing mouse: cerebellar neuronal loss and gene expression during alcohol-vulnerable and -resistant periods. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 2008; 32: 1439-50.

Katner SN, Davis SA, Kirsten AJ, Taffe MA. Effects of nicotine and mecamylamine on cognition in rhesus monkeys. *Psychopharmacology* 2004; 175: 225-40.

Kelly SJ, Lawrence CR. Intra-gastric intubation of alcohol during the perinatal period. *Methods in Molecular Biology*, 2008; 447: 101-10.

Kenney, J.W., et al., Learning and nicotine interact to increase CREB phosphorylation at the jnk1 promoter in the hippocampus. *PloS one*, 2012. 7(6): p. e39939.

Klintsova AY, Goodlett CR, Greenough WT. Therapeutic motor training ameliorates cerebellar effects of postnatal binge alcohol. *Neurotoxicology and Teratology*, 2000; 22: 125-132.

Kodituwakku PW, Handmaker NS, Cutler SK, Weathersby EK, Handmaker SD. Specific impairments in self-regulation in children exposed to alcohol prenatally. *Alcohol ClinExpRes*. 1995;19:1558-64.

Koelega HS. Alcohol and vigilance performance: a review. *Psychopharmacology (Berl)*, 1995; 118: 233-249.

Kotch LE, Sulik KK. Experimental fetal alcohol syndrome: proposed pathogenic basis for a variety of associated facial and brain anomalies. *American Journal of Medical Genetics*, 1992; 44: 168-176.

Krahe TE, Wang W, Medina AE. Phosphodiesterase inhibition increases CREB phosphorylation and restores orientation selectivity in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *PLoS One*. 2009 Aug 14;4(8):e6643. doi: 10.1371/journal.pone.0006643.

Kuehn D1, Aros S, Cassorla F, Avaria M, Unanue N, Henriquez C, Kleinstuber K, Conca B, Avila A, Carter TC, Conley MR, Troendle J, Mills JL. A prospective cohort study of the prevalence of growth, facial, and central nervous system abnormalities in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012 Oct;36(10):1811-9. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01794.x. Epub 2012 Jul 23.

Kully-Martens K, Denys K, Treit S, Tamana S, Rasmussen C. A review of social skills deficits in individuals with fetal alcohol spectrum disorders and prenatal alcohol exposure: profiles, mechanisms, and interventions. *Alcohol ClinExp Res*. 2012;36:568-76.

Kumar V, Singh RK, Jaiswal AK, Bhattacharya SK, Acharya SB. Anxiolytic activity of Indian Abies pindrow Royle leaves in rodents: an experimental study. *Indian J. Exp. Biol.*, 2000; 38: 343-6.

Lacroix P, Quiniou MJ, Linee P, Le Polles JB. Cerebral metabolic and hemodynamic activities of l-eburnamonine in the anesthetized dog. A comparison with vincamine. *Arzneimittelforschung*, 1979; 29: 1094-1101.

Lacy RT1, Brown RW, Morgan AJ, Mactutus CF, Harrod SB. Intravenous Prenatal Nicotine Exposure Alters METH-Induced Hyperactivity, Conditioned Hyperactivity, and BDNF in Adult Rat Offspring. *Dev Neurosci*. 2016;38(3):171-185. Epub 2016 Jun 11.

- Lakics V1, Karran EH, Boess FG. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*. 2010 Nov;59(6):367-74. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.05.004. Epub 2010 May 21.
- Lamprecht A, Ledoux J. Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004; 5: 45-54.
- Lamprecht R. CREB: a message to remember. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999; 55: 554-563.
- Lantz CL, Wang W, Medina AE. 2012. Early alcohol exposure disrupts visual cortex plasticity in mice. *Int J Dev Neurosci* 30:351–357.
- Larsson A1, Engel JA. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004 Jan;27(8):713-20.
- Lasser K, Boyd JM, Woolhandler S, Himmelstein DU, McCormic D, Bor DH. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. *The journal of American medical association*; 2000; 284: 2606-10.
- Lavaur, J., Bernard, F., Trifilieff, P., Pascoli, V., Kappes, V., Pages, C., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2008). A TAT-DEF-Elk-1 peptide regulates the cytonuclear trafficking of Elk-1 and controls cytoskeleton dynamics. *J. Neurosci*. 27, 14448–14458.
- Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. 2013;8:2531-7.
- Lendvai, B., Zelles, T., Rozsa, B., Vizi, E.S., 2003. A vinca alkaloid enhances morphological dynamics of dendritic spines of neocortical layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Research Bulletin* 59, 257–260.
- Leone A. Biochemical markers of cardiovascular damage from tobacco smoke. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 2199-208.
- Li J, Bo L, Zhang P, Gao Q, Li L, Tang J, Wu C1, Li D, Xiao J, Chen J, Tao J, Mao C, Xu Z. Exposure to nicotine during pregnancy and altered learning and memory in the rat offspring. *Nicotine Tob Res*. 2015 Jun;17(6):661-6. doi: 10.1093/ntr/ntu178. Epub 2014 Sep 19.
- Lima José Mauro Braz (2008). Álcool e gravidez, Síndrome Alcoólica Fetal SAF (tabaco e outras drogas). Medbook (ed). Introdução, 1-5.
- Little HJ. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol Research & Health*, 2000; 24(4): 215-224.
- 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.
- Lonze BE1, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002 Aug 15;35(4):605-23.

- Low CM, Wee KS. New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *MolPharmacol.* 2010;78:1-11.
- Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus *The Journal of Neuroscience*, 1999 ;19: 10250-10261.
- Lucas BR, Latimer J, Pinto RZ, Ferreira ML, Doney R, Lau M, et al. Gross motor deficits in children prenatally exposed to alcohol: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2014;134:e192-209.
- Maier SE, West JR. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. *Alcohol Research & Health*, 2001; 25: 168-174.
- Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*, 1999 17; 285:1870-1874.
- Malenka, R. C., and Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21.
- Malinow R1, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 2002;25:103-26. Epub 2002 Mar 4.
- Malisza KL, Allman AA, Shiloff D, Jakobson L, Longstaffe S, Chudley AE. Evaluation of spatial working memory function in children and adults with fetal alcohol spectrum disorders: a functional magnetic resonance imaging study. *Pediatr Res.* 2005;58:1150-7.
- Manji S, Pei J, Loomes C, Rasmussen C. A review of the verbal and visual memory impairments in children with foetal alcohol spectrum disorders. *DevNeurorehabil.* 2009;12:239-47.
- Martin JC, Becker RF. The effects of maternal nicotine absorption or hypoxic episodes upon appetitive behavior of rat offspring. *Developmental psychobiology* 1971;4:133–47.
- Martin J, Martin DC, Lund CA, Streissguth AP. Maternal alcohol ingestion and cigarette smoking and their effects on newborn conditioning. *Alcohol Clin Exp Res.* 1977 Jul;1(3):243-7.
- Marttila K, Raattamaa H, Ahtee L. Effects of chronic nicotine administration and its withdrawal on striatal FosB/DeltaFosB and c-Fos expression in rats and mice. *Neuropharmacology* 2006;51:44–51.
- Matta SG1, Elberger AJ. Combined exposure to nicotine and ethanol throughout full gestation results in enhanced acquisition of nicotine self-administration in young adult rat offspring. *Psychopharmacology (Berl).* 2007 Aug;193(2):199-213. Epub 2007 Apr 3.
- May PA, Fiorentino D, Coriale G, Kalberg WO, Hoyme HE, Aragon AS e colaboradores. Prevalence of children with severe fetal alcohol spectrum disorders in communities near rome, Italy: new estimated rates are higher than previous estimates. *Int.J. Environ. Res. Public Health.* 8: 2331-2351, 2011;

- May PA, Gossage JP, Kalberg WO, Robinson LK, Buckley D, Manning M, Hoyme HE. Prevalence and epidemiologic characteristics of FASD from various research methods with an emphasis on recent in-school studies. *Dev Disabil Res Rev.* 15(3):176-92, 2009.
- May PA, Gossage JP. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Res.Health.* 25: 159-167, 2001.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261–263.
- McGinnis JM, Foege WH. Actual causes of death in the United States. *JAMA*, 270: 1993. 2207-2212.
- McMurray MS1, Williams SK, Jarrett TM, Cox ET, Fay EE, Overstreet DH, Walker CH, Johns JM. Gestational ethanol and nicotine exposure: effects on maternal behavior, oxytocin, and offspring ethanol intake in the rat. *Neurotoxicol Teratol.* 2008 Nov-Dec;30(6):475-86. doi: 10.1016/j.ntt.2008.07.001. Epub 2008 Jul 11.
- McWilliams JR, Lynch G. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science.* 1983 Aug 5;221(4610):572-4.
- Medina AE, Krahe TE (2008) Neocortical plasticity deficits in fetal alcohol spectrum disorders: Lessons from Barrel and Visual Cortex. *J Neurosci Res* 86: 256–263.
- Medina AE, Krahe TE, Coppola DM, Ramoa AS. Neonatal alcohol exposure induces long-lasting impairment of visual cortical plasticity in ferrets. *The Journal of Neuroscience*, 2003; 23: 10002-10012.
- Medina AE, Krahe TE, Ramoa AS (2005) Early Alcohol Exposure Induces Persistent Alteration of Cortical Columnar Organization and Reduced Orientation Selectivity in the Visual Cortex. *J Neurophysiol* 93: 1317–1325.
- Medina AE, Krahe TE, Ramoa AS (2006) Restoration of Neuronal Plasticity by a Phosphodiesterase Type 1 Inhibitor in a Model of Fetal Alcohol Exposure. *J Neurosci* 26: 1057–1060.
- Medina AE, Ramoa AS. Early alcohol exposure impairs ocular dominance plasticity throughout the critical period. *Developmental Brain Research*, 2005; 157: 107-111.
- Medina AE. Vinpocetine as a potent antiinflammatory agent. *Proceedings of the National Academy of Science of U S A*, 2010; 107: 9921-9922.
- Medina AE. Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions. *Front Neurosci.* 2011 Feb 18;5:21. doi: 10.3389/fnins.2011.00021. eCollection 2011.
- Mendelsohn C1, Gould GS, Oncken C. Management of smoking in pregnant women. *Aust Fam Physician.* 2014 Jan-Feb;43(1):46-51.
- Michel, M., Green, C.L., Eskin, A., Lyons, L.C., 2011. PKG-mediated MAPK signaling is necessary for long-term operant memory in aplysia. *Learning and Memory* 18, 108–117.

- Milberger S, Biederman J, Faraone SV, Jones J. Further evidence of an association between maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder: findings from a high-risk sample of siblings. *The Journal of Clinical Child Psychology* 1998;27:352–8
- MILLER WM. Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1996; 20: 139-143.
- Miller NS, Gold MS. Comorbid cigarette and alcohol addiction: epidemiology and treatment. *J Addict Dis.* 1998;17(1):55-66. Review.
- Mitchell EA, Ford RP, Stewart AW, Taylor BJ, Becroft DM, Thompson JM, Scragg R, Hassall IB, Barry DM, Allen EM, et al. Smoking and the sudden infant death syndrome. *Pediatrics.* 1993 May;91(5):893-6.
- Mizrak S, Turan V, Caglayan O, Ercan G. The Effect of Long Term Pre/postnatal Low/high Dose Nicotine Exposure on Tissue Oxidant/antioxidant Status and DNA Damage in Rats. *Drug Res (Stuttg).* 2015 Aug;65(8):432-6. doi: 10.1055/s-0034-1387739. Epub 2014 Sep 4.
- MMWR. Smoking during pregnancy-United States, 1990-2002. *Morbidity Mortal Weekly Report.* 53: 911-915, 2004.
- Molnar, P., Gaal, L., 1992. Effect of different subtypes of cognition enhancers on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *European Journal of Pharmacology* 215, 17–22.
- Molnar, P., Gaal, L., Horvath, C., 1994. The impairment of long-term potentiation in rats with medial septal lesion and its restoration by cognition enhancers. *Neurobiology (Bp)* 2, 255–266.
- Monti B, Berteotti C, Contestabile A (2006) Subchronic rolipram delivery activates hippocampal CREB and arc, enhances retention and slows down extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 31: 278–286.
- Morgan AJ, Harrod SB, Lacy RT, Stanley EM, Fadel JR: Intravenous prenatal nicotine exposure increases orexin expression in the lateral hypothalamus and orexin innervation of the ventral tegmental area in adult male rats. *Drug Alcohol Depend* 2013;132:562–570.
- Morissette SB, Tull MT, Gulliver SB, Kamholz BW, Zimering RT. Anxiety, anxiety disorders, tobacco use, and nicotine: a critical review of interrelationships. *Psychology Bulletin*; 2007.133:245-72.
- Motaghinejad M, Motevalian M, Fatima S, Hashemi H, Gholami M. Curcumin confers neuroprotection against alcohol-induced hippocampal neurodegeneration via CREB-BDNF pathway in rats. *Biomed Pharmacother.* 2017 Mar;87:721-740. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.020. Epub 2017 Jan 14.
- Mower AF, Liao DS, Nestler EJ, Neve RL, Ramoa AS. cAMP/Ca²⁺ response element-binding protein function is essential for ocular dominance plasticity. *Journal of Neuroscience*, 2002; 22: 2237-245.
- Nakauchi S, Malvaez M, Su H1, Kleeman E, Dang R, Wood MA, Sumikawa K2. Early postnatal nicotine exposure causes hippocampus-dependent memory impairments in adolescent mice: Association with altered nicotinic cholinergic modulation of LTP, but not

impaired LTP. *Neurobiol Learn Mem.* 2015 Feb;118:178-88. doi: 10.1016/j.nlm.2014.12.007. Epub 2014 Dec 27.

Navarro HA, Seidler FJ, Schwartz RD, et al. Prenatal exposure to nicotine impairs nervous system development at a dose which does not affect viability or growth. *Brain Res Bull* 23:187–192. 1989.

Navarro HA, Seidler FJ, Whitmore WL, Slotkin TA: Prenatal exposure to nicotine via maternal infusions: effects on development of catecholamine systems. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:940–944.

Nicholson CD. Pharmacology of nootropics and metabolically active compounds in relation to their use in dementia. *Psychopharmacology*, 1990; 101:147-59.

Nordberg A, Zhang XA, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal nicotine exposure induces permanent changes in brain nicotinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 1991 Nov 19;63(1-2):201-7.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 307, 462–465.

Nowoslawski L, Klocke BJ, Roth KA. Molecular regulation of acute ethanol-induced neuron apoptosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2005; 64: 490-497.

Nunes F, Ferreira-Rosa K, Pereira Mdos S, Kubrusly RC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC. Acute administration of vinpocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of fetal alcohol spectrum disorder. *Drug Alcohol Depend.* 2011 Dec 1;119(1-2):81-7. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2011.05.024. Epub 2011 Sep 9.

Nunes-Freitas AL, Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Dutra-Tavares AC, Manhães AC, Lisboa PC, et al. Nicotine exposure during the third trimester equivalent of human gestation: Time course of effects on the central cholinergic system of rats. *ToxicolSci.* 2011;123:144-54.

Nuutinen S, Ahtee L, Tuominen RK. Time and brain region specific up-regulation of low affinity neuronal nicotinic receptors during chronic nicotine administration in mice. *Eur J Pharmacol* 2005;515: 83–9.

Ohta K, Sakata-haga H, Fukui Y. Alteration in anxiety-related behaviors and reduction of serotonergic neurons in raphe nuclei in adult rats prenatally exposed to ethanol. *Congenital Anomalies (Kyoto)*, 2010; 50: 105-114.

O'leary-moore SK, Mcmechan AP, Mathison SN, Berman RF, Hannigan JH. Reversal learning after prenatal or early postnatal alcohol exposure in juvenile and adult rats. *Alcohol*, 2006; 38: 99-110.

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. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.06.009. Epub 2009 Jul 1.

Oliveira-da-Silva A1, 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 during drug withdrawal. *Neuroscience*. 2010 Apr 28;167(1):163-73. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.01.060. Epub 2010 Feb 4.

Oliveira-Pinto J, Paes-Branco D, Cristina-Rodrigues F, Krahe TE, Manhães AC, Abreu-Villaça Y, et al. GABAA overactivation potentiates the effects of NMDA blockade during the brain growth spurt in eliciting locomotor hyperactivity in juvenile mice. *NeurotoxicolTeratol*. 2015;50:43-52.

Olney JW. Fetal alcohol syndrome at the cellular level. *Addiction Biology*, 2004; 9: 137-149.

Olney JW. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology*. 2002;23:659-68.

Olney JW. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology*, 2002; 23: 659-668.

Ota KT, Pierre VJ, Ploski JE, Queen K, Schafe GE. The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learning & Memory*, 2008; 15: 792-805.

P.R.A. Heckman, A. Blokland, J. Ramaekers, J. Prickaerts. PDE and cognitive processing: Beyond the memory domain. *Neurobiology of Learning and Memory* 119 (2015) 108–122. Invited Review.

Paine TA, Neve RL, Carlezon WA, JR. Attention deficits and hyperactivity following inhibition of cAMP-dependent protein kinase within the medial prefrontal cortex of rats. *Neuropsychopharmacology*, 2009; 34: 2143-2155.

Paine, T.A., Neve, R.L., Carlezon Jr., W.A., 2009. Attention deficits and hyperactivity following inhibition of cAMP-dependent protein kinase within the medial prefrontal cortex of rats. *Neuropsychopharmacology* 34, 2143–2155.

Pal N, Alkana RL. Use of inhalation to study the effect of ethanol and ethanol dependence on neonatal mouse development without maternal separation: a preliminary study. *Life Science*, 1997; 61: 1269-81.

Palanza, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci and Biobehav Revs.*, 2001; 25: 219-233.

Parkitna, J.R., Bilbao, A., Rieker, C., Engblom, D., Piechota, M., Nordheim, A., Spanagel, R., Schutz, G., 2010. Loss of the serum response factor in the dopamine system leads to hyperactivity. *FASEB J*. 24, 2427–2435

Parsons OA1, Nixon SJ. Cognitive functioning in sober social drinkers: a review of the research since 1986. *J Stud Alcohol*. 1998 Mar;59(2):180-90.

Pascoli, V., Valjent, E., Corbille, A.G., Corvol, J.C., Tassin, J.P., Girault, J.A., Herve, D., 2005. cAMP and extracellular signal-regulated kinase signaling in response to d-amphetamine and methylphenidate in the prefrontal cortex in vivo: role of beta 1-adrenoceptors. *Mol. Pharmacol*. 68, 421–429.

Patten AR, Gil-Mohapel J, Wortman RC, Noonan A, Brocardo PS, Christie BR (2013) Effects of ethanol exposure during distinct periods of brain development on hippocampal synaptic plasticity. *Brain Sci* 3:1076–109

Pauly JR, Sparks JA, Hauser KF, Pauly TH. In utero nicotine exposure causes persistent, gender-dependant changes in locomotor activity and sensitivity to nicotine in C57Bl/6 mice. *Int J Dev Neurosci*. 2004; 22, 329–337.

Pérez-Torres S1, Miró X, Palacios JM, Cortés R, Puigdoménech P, Mengod G. Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and[3H]rolipram binding autoradiography. Comparison with monkey and rat brain. *J Chem Neuroanat*. 2000 Dec;20(3-4):349-74.

Pham TA, Impey S, Storm DR, Stryker MP. CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period. *Neuron*, 1999; 22: 63-72.

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.

Pilz, R.B., Broderick, K.E., 2005. Role of cyclic GMP in gene regulation. *Frontiers in Bioscience* 10, 1239–1268.

Pintchovski, S. A., Peebles, C. L., Kim, H. J., Verdin, E., and Finkbeiner, S. (2009). The serum response factor and a putative novel transcription factor regulate expression of the immediate-early gene *Arc/Arg3.1* in neurons. *J. Neurosci*. 29, 1525–1537.

Quertemont E, Tambour S, Tirelli E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: A comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol.*, 2005. 75:247–274.

Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 21:775-777, 2005.

Ramanan, N., Shen, Y., Sarsfield, S., Lemberger, T., Schutz, G., Linden, D. J., and Ginty, D. D. (2005). SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat. Neurosci*. 8, 759–767.

Rapoport JL, Gogtay N. Brain neuroplasticity in healthy, hyperactive and psychotic children: insights from neuroimaging. *Neuropsychopharmacology*, 2008; 33: 181-197.

Rasmussen C. Executive functioning and working memory in fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Clin.Exp.Res*. 29: 1359-1367, 2005.

Rezvani AH, Levin ED. Nicotine-alcohol interactions and cognitive function in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002; 72: 865-872.

Ribeiro-Carvalho A1, Lima CS, Medeiros AH, Siqueira NR, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience*. 2009 Sep 15;162(4):1174-86. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.032. Epub 2009 May 22.

- Ribeiro-Carvalho A1, Lima CS, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Nicotine and ethanol interact during adolescence: effects on the central cholinergic systems. *Brain Res.* 2008 Sep 26;1232:48-60. doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.062. Epub 2008 Jul 28.
- Ribeiro-Carvalho A1, Lima CS, Nunes-Freitas AL, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on depressive-like behavior during exposure and withdrawal. *Behav Brain Res.* 2011 Aug 1;221(1):282-9. doi: 10.1016/j.bbr.2011.03.014. Epub 2011 Mar 21.
- Richardson DP, Byrnes ML, Brien JF, Reynolds JN, Dringenberg HC. Impaired acquisition in the water maze and hippocampal long-term potentiation after chronic prenatal ethanol exposure in the guinea-pig. *Eur J Neurosci.* 2002;16:1593-8.
- Riley EP, Infante MA, Warren KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol.Rev.* 2011; 21: 73-80.
- Riley EP, Mcgee CL. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Experimental Biology and Medicine*, 2005; 230: 357-365.
- Roberson R, Cameroni I, Toso L, Abebe D, Bissel S, Spong CY. Alterations in phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element of binding protein activity: a pathway for fetal alcohol syndrome-related neurotoxicity. *American Journal Obstet Gynecol.*, 2009; 200: 193.e1-5.
- Roebuck TM, Simmons RW, Mattson SN, Riley EP. Prenatal exposure to alcohol affects the ability to maintain postural balance. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1998; 22: 252-258.
- Roebuck-Spencer TM, Mattson SN, Marion SD, Brown WS, Riley EP. Bimanual coordination in alcohol-exposed children: role of the corpus callosum. *J Int Neuropsychol Soc.* 2004;10:536-48.
- Roguski EE, Sharp BM, Chen H, Matta SG. Full-gestational exposure to nicotine and ethanol augments nicotine self-administration by altering ventral tegmental dopaminergic function due to NMDA receptors in adolescent rats. *J Neurochem.* 2014 Mar;128(5):701-12. doi: 10.1111/jnc.12504. Epub 2013 Nov 15.
- Rosdy B, Balázs M, Szporny L. Biochemical effects of ethyl apovincamine. *Arzneimittelforschung*, 1976; 26: 1923-1926.
- Royal College of Physicians Nicotine Addiction in Britain, A report of the Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians. Royal College of Physicians of London, Royal College of Physicians of London. 2000.
- Russell, V.A., 2003. Dopamine hypofunction possibly results from a defect in glutamate-stimulated release of dopamine in the nucleus accumbens shell of a rat model for attention deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 671–682.
- Ryabinin AE, Cole M, Bloom FE, Wilson MC. Exposure of neonatal rats to alcohol by vapor inhalation demonstrates specificity of microcephaly and Purkinje cell loss but not astrogliosis. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1995; 19: 784-791.

Sadrian B, Lopez-Guzman M, Wilson DA, Saito M. Distinct neurobehavioral dysfunction based on the timing of developmental binge-like alcohol exposure. *Neuroscience*. 2014;280:204-19.

Samhsa. Results from the 2007 National Survey on Drug Use and Health: National findings. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Office of Applied Studies. 2008.

Savage DD, Queen SA, Sanchez CF, Paxton LL, Mahoney JC, Goodlett CR, West JR. Prenatal ethanol exposure during the last third of gestation in rat reduces hippocampal NMDA agonist binding site density in 45-day-old offspring. *Alcohol*, 1992; 9:

Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, Ledoux JE. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 2000; 20: 8177-8187.

Schambra UB, Nunley K, Harrison TA, Lewis CN. Consequences of low or moderate prenatal ethanol exposures during gastrulation or neurulation for open field activity and emotionality in mice. *Neurotoxicol Teratol*. 2016 Sep - Oct;57:39-53. doi: 10.1016/j.ntt.2016.06.003. Epub 2016 Jun 11.

Schlaepfer IR1, Hoft NR, Ehringer MA. The genetic components of alcohol and nicotine co-addiction: from genes to behavior. *Curr Drug Abuse Rev*. 2008 Jun;1(2):124-34.

Schneider S, Schütz J. Who smokes during pregnancy? A systematic literature review of population-based surveys conducted in developed countries between 1997 and 2000. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 13: 138-147, 2008.

Schochet TL, Kelley AE, Landry CF. Differential behavioral effects of nicotine exposure in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology* 2004; 175: 265-73.

Schuckit MA. Drug and alcohol abuse: a clinical guide to diagnosis and treatment. (6th edn.) Springer, New York, USA. 2006.

Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, 1991;254: 1503-6.

Senecky Y, Weiss N, Shalev SA, Peleg D, Inbar D, Chodick G, et al. Alcohol consumption during pregnancy among women in Israel. *JPopulTherClinPharmacol*. 2011;18:e261-e72.

Serulle, Y., Zhang, S., Ninan, I., Puzzo, D., McCarthy, M., Khatri, L., Arancio, O., and Ziff, E. B. (2007). A GluR1-cGKII interaction regulates AMPA receptor trafficking. *Neuron* 56, 670–688.

Shibota M, Kakihana M, Nagaoka A. The effect of vinpocetine on brain glucose uptake in mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 1982; 80: 221-224.

Shu XO1, Hatch MC, Mills J, Clemens J, Susser M. Maternal smoking, alcohol drinking, caffeine consumption, and fetal growth: results from a prospective study.

Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W., and Kida, S. (1998). CREB and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 127–148.

Slikker WJ, Xu ZA, Levin ED, Slotkin TA. Mode of action: disruption of brain cell replication, second messenger, and neurotransmitter systems during development leading to cognitive dysfunction--developmental neurotoxicity of nicotine. *Crit Rev Toxicol* 2005; 35: 703-11.

Slotkin TA et al. Perinatal exposure to environmental tobacco smoke upregulates nicotinic cholinergic receptors in monkey brain. *Brain Res Dev Brain Res.*, 2002; 133:175-79.

Sobell LC, Sobell MB, Kozlowski LT, Toneatto T. Alcohol or tobacco research versus alcohol and tobacco research. *Br J Addict.* 1990 Feb;85(2):263-9.

Son H, Lu YF, Zhuo M, Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. The specific role of cGMP in hippocampal LTP. *Learning & Memory*, 1998; 5:231-245.

Sorenson CA, Raskin LA, Suh Y. The effects of prenatal nicotine on radialarm maze performance in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1991;40:991-3.

Sparks JA, Pauly JR. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57B1/6 mice. *Psychopharmacology* 1999;141:145-53.

Sparks JA, Pauly JR. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57B1/6 mice. *Psychopharmacology* 1999;141:145-53.

Spear L1. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health.* 2000;24(2):115-23.

Spohr HL, Willms J, Steinhausen HC. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *J Pediatr.* 150: 175-9, 179, 2007.

Squire LR, Wixted JT, Clark RE. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8:872-83.

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.

Streissguth AP, Bookstein FL, Sampson PD, Barr HM. Neurobehavioral effects of prenatal alcohol: Part III. PLS analyses of neuropsychologic tests. *NeurotoxicolTeratol.* 1989;11:493-507.

Streissguth AP, Martin DC, Martin JC, Barr HM. The Seattle longitudinal prospective study on alcohol and pregnancy. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1981 Summer;3(2):223-33.

Sulik KK. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005;230:366-75.

Sutherland RJ, McDonald RJ, Savage DD. Prenatal exposure to moderate levels of ethanol can have long-lasting effects on hippocampal synaptic plasticity in adult offspring. *Hippocampus.* 1997;7:232-8.

Suzuki, S., Zhou, H., Neumaier, J. F., and Pham, T. A. (2007). Opposing functions of CREB and MKK1 synergistically regulate the geometry of dendritic spines in visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 503, 605–617.

Swart PC, Currin CB, Russell VA, Dimatelis JJ. Early ethanol exposure and vinpocetine treatment alter learning- and memory-related proteins in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *J Neurosci Res.* 2016 Sep 10. doi: 10.1002/jnr.23894.

Tammimaki A, Pietila K, Raattamaa H, Ahtee L. Effect of quinpirole on striatal dopamine release and locomotor activity in nicotine-treated mice. *Eur J Pharmacol* 2006;531:118–25.

TEIXEIRA MM, ROSSI AG, WILLIAMS TJ, HELLEWELL PG. Effects of phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on cutaneous inflammation in the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology*, 1994; 112: 332-340.

Thapar A, Fowler T, Rice F, Scourfield J, van den Bree M, Thomas H, Harold G, Hay D. Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry.* 2003 Nov;160(11):1985-9.

The World Health R. Global Status Report on Alcohol 2014. 2014. p. 1-86.

Thomas GA, Rhodes J, Ingram JR Mechanisms of disease: nicotine--a review of its actions in the context of gastrointestinal disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 536-44.

Thomas JD, Tran TD. Choline supplementation mitigates trace, but not delay, eyeblink conditioning deficits in rats exposed to alcohol during development. *Hippocampus.* 2012 Mar;22(3):619-30. doi: 10.1002/hipo.20925. Epub 2011 May 3.

Thomas JD1, Tran TD. Choline supplementation mitigates trace, but not delay, eyeblink conditioning deficits in rats exposed to alcohol during development. *Hippocampus.* 2012 Mar;22(3):619-30. doi: 10.1002/hipo.20925. Epub 2011 May 3

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.

Tizabi Y, Popke EJ, Rahman MA, Nespors SM, Grunberg NE: Hyperactivity induced by prenatal nicotine exposure is associated with an increase in cortical nicotinic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58:141–146.

Tong VT, Dietz PM, Morrow B, D'Angelo DV, Farr SL, Rockhill KM, England LJ, Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Trends in smoking before, during, and after pregnancy—pregnancy risk assessment monitoring system, United States, 40 sites, 2000–2010. *MMWR Surveill Summ* 62:1–19.

Tracy HA, Wayner MJ, Armstrong DL. Nicotine blocks ethanol and diazepam impairment of air righting and ethanol impairment of maze performance. *Alcohol*, 1999; 18: 123-130.

Tran TD, Cronise K, Marino MD, Jenkins WJ, Kelly SJ. Critical periods for the effects of alcohol exposure on brain weight, body weight, activity and investigation. *Behav Brain Res* 2000;116:99-110.

Tyan, S. W., Tsai, M. C., Lin, C. L., Ma, Y. L., and Lee, E. H. (2008). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances zif268 expression through the mediation of SRF and CREB1 associated with spatial memory formation. *J. Neurochem.* 105, 820–832.

U.S. Department of Health and Human Services. *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2014.

Uecker A, Nadel L. Spatial locations gone awry: object and spatial memory deficits in children with fetal alcohol syndrome. *Neuropsychologia*. 1996;34:209-23.

US Department of Health and Human Services. *The health consequences of smoking: nicotine addiction*. Office on smoking and health, US Government Printing Office, Office on smoking and health, US Government Printing Office. 1988.

US Department OF Public Health and Human Services. *The health consequences of smoking. Nicotine Addiction. A report of the Surgeon General*. Washington. 1988

Vihavainen T, Mijatovic J, Piepponen TP, Tuominen RK, Ahtee L. Effect of morphine on locomotor activity and striatal monoamine metabolism in nicotine-withdrawn mice. *Behav Brain Res* 2006;173:85–93.

Wagner JL, Zhou FC, Goodlett CR. Effects of one- and three-day binge alcohol exposure in neonatal C57BL/6 mice on spatial learning and memory in adolescence and adulthood. *Alcohol*. 2014;48:99-111.

Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*. 1976 May;83(3):482-504.

Wang PY, Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ, Brenowitz SD. Functional NMDA receptors at axonal growth cones of young hippocampal neurons. *JNeurosci*. 2011;31:9289-97.

Wei J, Wang J, Dwyer JB, Mangold J, Cao J, Leslie FM, Li MD: Gestational nicotine treatment modulates cell death/survival-related pathways in the brains of adolescent female rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011;14: 91–106.

Weitzman ER, Chen YY. The co-occurrence of smoking and drinking among young adults in college: national survey results from the United States. *Drug Alcohol Depend*. 2005 Dec 12;80(3):377-86.

Welch-Carre E. The neurodevelopmental consequences of prenatal alcohol exposure. *Advances in Neonatal Care: official journal of the national Association of Neonatal Nurses*, 2005; 5: 217-229.

West JR, Hamre KM, Cassell MD. Effects of ethanol exposure during the third trimester equivalent on neuron number in rat hippocampus and dentate gyrus. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1986; 10: 190-197.

West JR, Pierce DR (1986). Perinatal alcohol exposure and neuronal damage. In: West JR, Ed. Alcohol and Brain Development. New York: Oxford University Press.

Witschi H, Joad JP, Pinkerton KE. The toxicology of environmental tobacco smoke. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37: 29-52.

Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends in neurosciences*; 20: 92-8. 1997.

Woo NH, Lu B. Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: from development to cognitive disorders *Neuroscientist*, 2006; 12: 43-56.

World Health Organization. Global status report on alcohol and health. (2011)a.

Wozniak DF, Hartman RE, Boyle MP, Vogt SK, Brooks AR, Tenkova T, et al. Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. *NeurobiolDis.* 2004;17:403-14.

Wozniak DF, Hartman RE, Boyle MP, Vogt SK, Brooks AR, Tenkova T, et al. Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. *NeurobiolDis.* 2004;17:403-14.

Yanai J, Pick CG, Rogel-Fuchs Y, Zahalka EA. Alterations in hippocampal cholinergic receptors and hippocampal behaviors after early exposure to nicotine. *Brain Research Bulletin* 1992;29:363-8.

Young S, Sherrill DL, Arnott J, Diepeveen D, LeSouëf PN, Landau LI. Parental factors affecting respiratory function during the first year of life. *Pediatr Pulmonol.* 2000 May;29(5):331-40.

Zhang L, González-Chica DA, Cesar JA, Mendonza- Sassi RA, Beskow B, Larentis N, et al. Tabagismo materno durante a gestação e medidas antropométricas do recém-nascido: Um estudo de base populacional extremo sul do Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2011;27(9):1768-76.

Zhang Z, Sun QQ. Development of NMDA NR2 subunits and their roles in critical period maturation of neocortical GABAergic interneurons. *DevNeurobiol.* 2011;71:221-45.

Zhu J, Zhang X, Xu Y, Spencer TJ, Biederman J, Bhide PG: Prenatal nicotine exposure mouse model showing hyperactivity, reduced cingulate cortex volume, reduced dopamine turnover, and responsiveness to oral methylphenidate treatment. *J Neurosci* 2012; 32: 9410-9418.

Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*, 1994; 368: 635-9.

Zucca S, Valenzuela CF. Low concentrations of alcohol inhibit BDNF-dependent GABAergic plasticity via L-type Ca²⁺ channel inhibition in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. *JNeurosci.* 2010;30:6776-81.

Zvolensky MJ, Matthews T, Feldner T, Leen-Feldner EW, McLeish AC. Smoking and panic attacks, panic disorder, and agoraphobia: A review of the empirical literature. *Clinical Psychology Review* 2005; 25: 761-789.