



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ana Heloisa de Medeiros

**Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência:
alterações glutamatérgicas e na memória visuoespacial de camundongos**

Rio de Janeiro

2012

Ana Heloisa de Medeiros

**Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência:
alterações glutamatérgicas e na memória visuoespacial de camundongos**

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.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

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

Rio de Janeiro

2012

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

M488 Medeiros, Ana Heloísa de.

Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência: alterações glutamatérgicas e na memória visuoespacial de camundongos / Ana Heloísa de Medeiros. -2012.

135 f.

Orientador: Cláudio Carneiro Filgueiras.

Coorientadora: 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. Nicotina – Teses. 2. Bebidas alcoólicas – Teses. 3. Adolescência – Teses. 4. Memória – Efeito das drogas – Teses. 5. Adolescentes – Uso de álcool – Teses. I. Filgueiras, Cláudio Carneiro. II. Villaça, Yael de Abreu. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 611.132

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

Assinatura

Data

Ana Heloisa de Medeiros

**Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência:
alterações glutamatérgicas e na memória visuoespacial de camundongos**

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 10 de abril de 2012.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Adriana da Cunha Faria Melibeu
Universidade Federal Fluminense

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

Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Tania Marcourakis
Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos avós
Arlete Barreiro de Medeiros &
Luís Augusto de Medeiros
(*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Deus, com a certeza essencial de que nada em minha vida é por acaso, obrigada por chegar até aqui. Que eu tenha sabedoria e disciplina para usar todas as minhas potencialidades e conhecimentos para o Bem do próximo. Sem este propósito, de nada valeria este trabalho.

Família, obrigada por, finalmente, aceitarem e acreditarem minhas escolhas. Vocês são o que de mais importante há em minha vida. Amo vocês! Karlinha, cujo amor incondicional e recíproco ao longo destes quase 20 anos nos tornou família e me presenteou com nossos amados Alex, Bia e Gui, obrigada por compreender minhas longas e necessárias, mas indesejadas ausências. Dinda ama cada um de vocês infinitamente! Binho, meu irmão mais velho, sempre dá um nó na garganta falar do meu amor por você... Não preciso dizer nada. Pri, minha cunhada/afilhada, obrigada pelo alto astral, pelo apoio de sempre, pela garra e por fazer meu irmão feliz.

Meus amados e inseparáveis amigos do CPII, CEACE, COMEERJ, JA e UFRJ, estes últimos 4 anos foram particularmente difíceis para mim e teriam sido insuportáveis sem vocês. Obrigada pelo colo, pelo ombro, pelo ouvido, pelo braço forte para me reerguer nas quedas, por me darem todo o suporte que precisei. Obrigada por estarem SEMPRE ao meu lado. E que bom poder celebrar, agora, com vocês, mais esta conquista! Peço desculpas por não nominá-los aqui, um a um, ou este agradecimento seria bem maior que a Tese em si! Vocês se sabem... Nos agradecimentos da minha Dissertação, palidamente, eu tentei descrever a importância que vocês têm em minha vida. Não teria outras melhores palavras neste momento: “Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos.” (Vinícius de Moraes)

Um agradecimento especial a Lucia, Marina, Helena, Dona Aurora, Lola e Goopi, Martha, Nice, Leciane, Maria Josephina, Monica, Marcia, João, Álvaro, Thereza e Dona Lourdes, meus fiéis seguidores, companheiros e torcedores queridíssimos, alguns, desde a graduação, pela amizade e lealdade. Ainda há um longo caminho a seguir, sempre com vocês na lembrança e no coração.

Iô, minha dupla favorita! Você foi um grande presente que Deus colocou no meu caminho. Tanto tempo perto uma da outra, somente no CEACE fomos nos descobrir. Obrigada por absolutamente tudo (e tem tanta coisa nesse tudo...). Em especial, obrigada por abrir seu coração e me receber como uma amiga, parceira e mãe. Tenho aprendido muito com sua integridade, sua dedicação, seu empenho, sua seriedade, seu senso de humor fantástico,

com o exemplo de mãe, profissional, mulher e filha que você é para mim. Muitas caixinhas de lenço de papel nos aguardam, na vida e aos domingos. Que felicidade e que honra tê-la ao meu lado!

Alyson, pelo apoio nas horas mais difíceis, pelas dificuldades que me permitiram amadurecer e pela amizade que estamos construindo, obrigada de coração.

À professora e querida amiga Yael de Abreu Villaça, há quase 7 anos, você abriu as portas do Laboratório de Neurofisiologia para mim e com isso, um mundo de conhecimentos e possibilidades. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos e pela firmeza, às vezes, bastante contundente, mas não menos necessária, com que você me orientou. Obrigada por ter-me permitido crescer como pessoa e profissional. Não foi fácil, mas, hoje, se eu me sinto minimamente mais preparada para a vida “lá fora”, devo isso a você. Foi uma honra ter uma profissional tão competente, a quem tanto admiro e em quem me espelho, como “minha tia”. É gratificante e prazeroso ter-lhe como amiga (acolhedora, mas franca e cautelosa em momentos críticos – que não foram poucos!) e parceira (de gostos musicais, festas, danças, Lady, podrão, feira da Jorge Hudge...) e uma honra saber que sou sua primeira cria a seguir seus passos. Ai, ai... Deus seja louvado! Vou parar por aqui, ou isso vira testamento.

Ao professor e amigo Alex Christian Manhães, obrigada por enxergar além das aparências, por reconhecer e investir em minhas capacidades, em detrimento dos meus defeitos, quando eu não as julgava suficientes para o trabalho. Eu aprendi muito com a sua seriedade, comprometimento, disciplina, senso de justiça, de humor e arrogância. Chefíssimo, não poderia deixar de agradecer a peculiaridade e a multiplicidade com que se fez presente ao longo destes anos – como professor, orientador (com fartos 5% de atenção – e isso, com muita sorte!), chefe, amigo, duende, Google, consultor para rocks psicodélicos, “médico” do meu computador, Dart Veider... Com folga e galhardia, sentirei falta de dizer “Chefinho lindo do meu coração, eu também te amo!” em retribuição à sua ácida amabilidade.

Ao professor e amigo Cláudio Carneiro Filgueiras, eu já lhe agradei algumas vezes, mas não posso deixar de fazê-lo mais uma vez: ‘Craudinho’, não teria ousado ir tão longe sem o seu apoio, seu incentivo e a sua acreditação – foram decisivos em minha vida! Muito obrigada pelo brilhantismo com que nos ensina a pensar ciência e pela leveza e simplicidade com que nos ensina a levar a vida. Marchando com você, aprendi a arte de fazer amigos, a ler/escrever textos vomitáveis e lixorrentos, aprendi que nada é fácil, que é impossível dar (...) errado, que a ira de Murphy é implacável e não obstatamente tudo isso, ainda tenho um parceiro incomparável de cruzadinhas. Isso vai fazer uma falta...

À professora e companheira Regina Kubrusly, conhecer você foi algo ímpar nesse processo (algo entre desesperador e maravilhoso!). Agradeço os conhecimentos compartilhados, a forma como me recebeu em seu laboratório e me acolheu junto aos seus outros “filhos”, o incentivo e a amizade. Seu otimismo foi crucial! Agradeço também aos alunos do laboratório de Neurofarmacologia da UFF, João, Maurício, Matheus, Gabi, Mari, Isis, Adriana, Ian e Lucas, que super me acolheram e apoiaram a causa. E como não poderia faltar, agradeço ao Jacaré Pimpão por ele não ter estragado (muito) os nossos experimentos.

Às amigas, parceiras, cúmplices, filhotinhas e fiéis escudeiras Ana Cristina Carvalho e Renata Quaresma, que me aturaram ao longo desses anos, que toleraram os inúmeros defeitos e assumiram um ritmo frenético de trabalho, que me ouviram (os conselhos, críticas, ensinamentos, devaneios, ‘causos’ e ‘relatórios’ intermináveis), acudiram, encobriram, apoiaram, defenderam, abraçaram, choraram, beberam, dançaram, confabularam... Cris e Rê, física e moralmente, eu não teria chegado até aqui sem vocês! E como seguir sem?

Carlitcha, Anna do Flúor, Nathália-Michele e Maria da Fumaça, vocês também foram e são fundamentais ao longo destes anos no laboratório. Peço desculpas pelas muitas falhas que cometi e agradeço a oportunidade de crescimento e reparo. Mais do que companheiras de jornada, tenho-lhes como amigas.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Neurofisiologia, que atendem por Dr. Anderson/Andsu com seu *background* semiprofissional, meu Pretinho Básico, Zé Bicanca, Zé Bicanquinha, Jê, Moniquinha, Dani, Polvs, Jubel, Ju, Fabi, Jorge, Sylvão, Fê, Mabelzinha, Capitão, Cris, Mona, Vacona, Rafa, Jeffs (frio na barriga de ter esquecido alguém...) e todos aqueles que passaram por aqui durante minha jornada. É assim que vocês serão lembrados: com suas particularidades, suas histórias e muito carinho.

À Amélia Gomes, é uma alegria, um prazer e mais do que a minha obrigação fazer-lhe um agradecimento especial pelos anos de cooperação, paciência, presteza e amizade. Obrigada por absolutamente tudo: os inúmeros serviços, favores e socorros prestados, as conversas descontraídas nos corredores do Departamento, as novidades sobre Henri e agora, do pequeno Rian, a caça pelo nosso chefe... Você faz a diferença!

Dona Marlene, Ulisses e Henrique, que também muito cooperaram com este trabalho, obrigada! (aposto que o Henrique não vai perder a oportunidade de cobrar “10 real” para colocar seu nome nos agradecimentos...)

À doce e confiante Andrea Deslandes e à esdúbidã Letícia Brito, que me abriram, generosamente, as portas do LaNEx (e do coração) e acabaram por me apontar um novo caminho, redirecionando-me os passos. Por tudo o que têm feito por mim desde o nosso

primeiro re/encontro: o acolhimento, a disponibilidade, o apoio, o incentivo, a torcida, a generosidade... Em especial, gostaria de lhes agradecer pela humanidade com que conduzem seus trabalhos, fazendo com que todo o brilhantismo acadêmico faça sentido neste mundo.

Kauê Maia, continue segurando firme a minha mão, sempre com serenidade e otimismo, olhando nos meus olhos e me fazendo perceber, através das suas atitudes, que vale a pena. Pela coragem e pela maturidade que crescem em mim ao seu lado, obrigada.

Por fim, agradeço sinceramente a todos que tiveram a curiosidade e a paciência de ler estes agradecimentos e que terão a coragem de ler este trabalho.

RESUMO

MEDEIROS, Ana Heloisa de. *Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência*: alterações glutamatérgicas e na memória visuoespacial de camundongos. 2012. 135 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Adolescentes humanos frequentemente associam o fumo do tabaco ao consumo de bebidas alcoólicas. Apesar desta associação, pouco se sabe sobre a neurobiologia básica da coexposição no cérebro adolescente. No presente estudo, avaliamos os efeitos da exposição, que ocorreu do 30º ao 45º dia de vida pós natal (PN30 a PN45), à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência (PN38-45) e da retirada (PN50-57) na memória visuoespacial através do Labirinto Aquático de Morris (LAM: 6 sessões + 1 prova, 3 tentativas/sessão, latência = 2 min), em 4 grupos de camundongos Suíços machos e fêmeas: (1) exposição concomitante à NIC [solução de nicotina *free base* (50 µg/ml) em sacarina a 2% para beber] e ETOH [solução de etanol (25%, 2 g/kg) injetada i.p. em dias alternados]; (2) exposição à NIC; (3) exposição ao ETOH; (4) veículo (VEH). Uma vez que os resultados comportamentais podem sofrer a interferência de alterações motoras, avaliamos (a) a atividade locomotora no Teste de Campo Aberto (sessão única, 5 min) e (b) a coordenação e o equilíbrio no Teste de Locomoção Forçada sobre Cilindro Giratório (5 tentativas, latência = 2 min). Para os efeitos da exposição à NIC e/ou ao ETOH na eficiência do transporte de aminoácidos excitatórios, avaliamos a captação de [3H] D-aspartato no hipocampo. A expressão do transportador glial GLAST/EAAT1 foi avaliada por *Western-blot*. Durante a exposição, animais ETOH e NIC+ETOH apresentaram déficits de memória nas sessões de teste e de prova no LAM enquanto, na retirada, os grupos NIC e NIC+ETOH apresentaram prejuízos na retenção. Não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamento em nenhum dos parâmetros testados em ambos os testes motores, tanto na exposição quanto na abstinência. Os grupos NIC, ETOH e NIC+ETOH tiveram uma diminuição significativa na captação de [3H] D-aspartato ao final do período de exposição, com uma normalização da atividade dos EAATs na retirada das drogas. O tratamento com NIC e ETOH reduziu ainda a expressão de GLAST/EAAT1 no hipocampo em ambas as idades testadas. O uso de etanol na adolescência causa prejuízos à memória de camundongos, com um efeito negativo mais acentuado quando associado à nicotina. Contudo, a retirada da nicotina apresentou um efeito mandatório nos danos encontrados. Ambas as drogas, isoladamente ou na coexposição, alteram os níveis de atividade e expressão dos EAATs, sugerindo que os resultados bioquímicos estejam implicados nas alterações comportamentais encontradas.

Palavras-chave: Adolescência. Etanol. Nicotina. Memória. Labirinto Aquático de Morris.

Transportadores de Aminoácidos Excitatórios.

ABSTRACT

Human adolescents frequently associate tobacco smoke and alcoholic drinks. Despite this association, little is known about the basic neurobiology of co-exposure in the adolescent brain. In the present study, we assessed the effects of nicotine and/or ethanol exposure (postnatal days 30 to 45: PN30-45) during adolescence (PN38-45) and withdrawal (PN50-57) on visuospatial memory through the Morris Water Maze (MWM: 6 sessions + 1 probe, 3 trials/session, latency = 2 min), in four groups of male and female Swiss mice: (1) Concomitant NIC [nicotine free base solution (50µg/ml) in 2% saccharin to drink] and ETOH [ethanol solution (25%, 2g/kg) i.p. injected every other day] exposure; (2) NIC exposure; (3) ETOH exposure; (4) Vehicle (VEH). Once behavioral results can be affected by motor disorders, we assessed (a) locomotor activity through the Open field Test (one session, 5 min) and (b) coordination and balance through the ROTAROD Test (5 trials, latency = 2 min). To investigate the effects of NIC and/or ETOH exposure on the efficiency on excitatory amino acid transport, we assessed the [3H] D-aspartate uptake in mice hippocampus. The GLAST/EAAT1, a glial transporter, was assessed by Western-blot technique. During exposure, ETOH and NIC+ETOH animals showed deficits on memory through the session and probe trial in WMW while, during withdrawal, NIC and NIC+ETOH groups showed impairments on retention. There were no significant differences between the experimental groups in any parameters assessed in both motor tests, either during exposure and withdrawal. There was a significant decrease in the [3H] D-aspartate for NIC, ETOH and NIC+ETOH groups in the end of exposure, turning to the normal levels of EAATs activity during withdrawal. The NIC and ETOH treatment decreased the GLAST/EAAT1 expression on hippocampus in all ages tested. Ethanol use leads to memory impairments in adolescent mice, with more preeminent effects when associated to nicotine. However, the nicotine withdrawal showed a mandatory effect on memory impairments. Both drugs, singly or in co-exposure, alter activity and expression of EAATs, which suggests that biochemical results may be associated to the behavioral alterations.

Keywords: Adolescence. Ethanol. Nicotine. Memory. Morris Water Maze. Amino Acid Excitatory Transporters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração esquemática das vias de formação e destino do glutamato	17
Figura 2A -	Ilustração do hipocampo em um corte sagital do cérebro	23
Figura 2B -	Representação esquemática do hipocampo em corte coronal	23
Figura 3 -	Ilustração esquemática da sala do teste Labirinto Aquático de Morris	46
Figura 4 -	Ilustração esquemática da caixa de testes de campo aberto	47
Figura 5 -	Fotografia do aparelho de teste de locomoção forçada em cilindro giratório	48
Figura 6 -	Médias de massa corporal	56
Figura 7 -	Médias de ingesta líquida/massa corporal	57
Figura 8 -	Médias de consumo de nicotina	58
Figura 9A -	Média de latência ao longo das sessões – machos PN45	60
Figura 9B -	Média de latência ao longo das sessões – fêmeas PN45	60
Figura 9C -	Média de latência das sessões – PN45	60
Figura 9D -	Média do número de investidas em cada quadrante – PN45	60
Figura 10A -	Média de latência ao longo das sessões – PN57	61
Figura 10B -	Média de latência das sessões – PN57	61
Figura 10C -	Média do número de investidas em cada quadrante – PN57	61
Figura 11A -	Média de retângulos deambulados no centro – PN45	62
Figura 11B -	Média de retângulos deambulados na periferia – PN45	62
Figura 11C -	Média do total de retângulos deambulados – PN45	62
Figura 11D -	Média do percentual de retângulos deambulados no centro – PN45	62
Figura 11E -	Média de retângulos deambulados no centro/periferia – PN45	63
Figura 11F -	Média de retângulos deambulados no centro – PN57	63
Figura 11G -	Média de retângulos deambulados na periferia – PN57	63
Figura 11H -	Média do total de retângulos deambulados – PN57	63

Figura 11I -	Média de retângulos deambulados no centro/periferia – PN57	63
Figura 11J -	Média de retângulos deambulados no centro/periferia – PN57	63
Figura 12A -	Média da latência sobre plataforma giratória ao longo das tentativas – PN45	64
Figura 12B -	Média da latência sobre plataforma giratória ao longo das tentativas – PN57	64
Figura 13A -	Captação de D-aspartato dependente de temperatura e condição iônica	65
Figura 13B -	Captação de D-aspartato dependente de saturação	65
Figura 13C -	Captação de D-aspartato ao longo do desenvolvimento	65
Figura 14A -	Captação de D-aspartato na exposição a NIC e/ou ETOH – PN45	66
Figura 14B -	Captação de D-aspartato na exposição a NIC e/ou ETOH – PN50	66
Figura 14C -	Captação de D-aspartato na exposição a NIC e/ou ETOH – PN57	66
Figura 15 -	Bloqueio da captação de D-aspartato	67
Figura 16A -	Captação de D-aspartato na exposição a NIC e/ou ETOH	68
Figura 16B -	Captação de D-aspartato na exposição a NIC e/ou ETOH	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[3H]	Material marcado radioativamente com Trício
°C	Graus Celsius
μCi	MicroCurie
μg	Microgramas
AAE	Aminoácido (s) Excitatório (s)
<i>ad lib</i>	<i>ad libitum</i>
AMPA	Receptor glutamatérgico ionotrópico ácido α-amino-3-hidroxi-metil-4-isoxazolepropionico
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ANOVA _r	Análise de variância de repetição
APS	Persulfato de amônia
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina sérica bovina
CaMK	Cálcio/calmodulina
cm	Centímetros
D-	Dextrógiro
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EAAC1	<i>Excitatory amino acid carrier</i>
EAAT1	Transportador de aminoácido excitatório-1
EAAT2	Transportador de aminoácido excitatório-2
EAAT3	Transportador de aminoácido excitatório-3
EAAT4	Transportador de aminoácido excitatório-4
EAAT5	Transportador de aminoácido excitatório-5
ECL	Quimioluminescência
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
E.P.M.	Erro padrão da média
ERKs	Cinase reguladora de sinalização extracelular
ETOH	Grupo exposto ao etanol
F	Razão de Fischer
FPLSD	<i>Fisher's Protected Least Significant Difference</i>
g	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLAST	<i>Glutamate-aspartate transporter</i>
GLT-1	<i>Glutamate transporter</i>
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
H	Horas
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

i.p.	Intra-peritoneal
KA	Receptor glutamatérgico ionotrópico cainato
kDa	QuiloDalton
Kg	Quilograma
L-	Levógiro
LTP	<i>Long-term potentiation</i> / potenciação de longa duração
mGluR	Receptor glutamatérgico metabotrópico
ml	Mililitros
n	Tamanho da amostra
nAChRs	Receptores colinérgicos nicotínicos
NIC	Grupo exposto à nicotina
NIC+ETOH	Grupo exposto à nicotina e ao etanol
NMDA	Receptor glutamatérgico ionotrópico N-metil D-aspartato
P	Valor de prova
PKA	Proteína cinase AMPc-dependente
PKC	Proteína cinase cálcio-dependente
PKG	Proteína cinase GMPc-dependente
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
pmol/mg/hora	Picomol por miligrama de proteína por hora
PN	Dia pós-natal
s	Segundo (s)
SDS	Sódio dodecil sulfato
SNC	Sistema nervoso central
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TTBS	<i>Tris-Tween Buffered Saline</i>
VGLUTs	Transportadores vesiculares de glutamato
v/v	Volume/volume
VEH	Grupo controle

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 OBJETIVOS	40
2 MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1 Animais experimentais	41
2.2 Distribuição dos animais por grupo experimental	42
2.2.1 Grupo exposto à nicotina e ao etanol (NIC+ETOH)	42
2.2.2 Grupo exposto à nicotina (NIC)	42
2.2.3 Grupo exposto ao etanol (ETOH)	43
2.2.4 Grupo controle (VEH)	43
2.3 Tratamento	43
2.3.1 Administração de nicotina e etanol e medidas de massa corporal e ingesta de líquido	43
2.4 Testes Comportamentais	45
2.4.1 Labirinto Aquático de Morris	45
2.4.2 Teste de campo aberto	47
2.4.3 Teste de locomoção forçada em cilindro giratório – ROTAROD	48
2.5 Avaliação bioquímica	49
2.5.1 Medidas dos níveis séricos de cotinina e etanol	49
2.5.2 Avaliação do perfil de captação de [3H] D-aspartato em hipocampo	50
2.5.3 Influência de NIC e/ou ETOH na captação de [3H] D-aspartato	51
2.5.4 Avaliação dos EAATs	51
2.6. Análise estatística	53
2.6.1 Análise da relação ingesta de líquido / massa corporal, consumo de nicotina e massa corporal	53
2.6.2 Labirinto Aquático de Morris	54

2.6.3	<u>Teste de campo aberto</u>	54
2.6.4	<u>Teste de locomoção forçada em cilindro giratório – ROTAROD</u>	54
2.6.5	<u>Transporte de aminoácidos excitatórios</u>	55
2.7	Análise das interações entre nicotina e etanol	55
3	RESULTADOS	56
3.1	Efeitos no peso corporal, ingesta/peso e consumo de nicotina	56
3.2	Medidas séricas de cotinina e etanol	58
3.3	Labirinto Aquático de Morris	59
3.4	Teste de campo aberto	62
3.5	Teste de locomoção forçada sobre cilindro giratório – ROTAROD	64
3.6	Análise bioquímica do sistema glutamatérgico	64
3.6.1	<u>Condições de temperatura, dependência iônica e curva de saturação; captação de [3H] D-aspartato ao longo do desenvolvimento</u>	64
3.6.2	<u>Efeitos na atividade dos transportadores de aminoácidos excitatórios</u>	66
3.6.3	<u>Bloqueio de transportadores de aminoácido excitatório</u>	67
3.6.4	<u>Efeitos na expressão do transportador glial GLAST/EAAT1</u>	67
4	DISCUSSÃO	69
4.1	Considerações metodológicas	69
4.2	Efeitos no massa corporal, ingesta/massa e consumo de nicotina	70
4.3	Medidas séricas de cotinina e etanol	71
4.4	Labirinto Aquático de Morris	73
4.5	Teste de campo aberto e de locomoção forçada em cilindro giratório	78
4.6	Análise bioquímica do sistema glutamatérgico	81
5	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90

INTRODUÇÃO

Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato é um aminoácido que medeia a maioria das sinapses excitatórias no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (Fonnum, 1984; Mayer, 1987): seus níveis podem ser até 10.000 vezes mais elevados do que os observados para outros neurotransmissores, como a dopamina ou a serotonina (Schousboe, 1981). Os receptores de glutamato estão localizados em todos os elementos celulares neuronais, como dendritos, terminais axônicos, corpos celulares e terminal pós-sináptico (Lujan et al., 1997), bem como nas células gliais (Petrálie & Wenthold, 1992). Os neurônios glutamatérgicos são encontrados no córtex e em estruturas subcorticais, como hipocampo, núcleo caudato, núcleos talâmicos e cerebelo (Paul & Skolnick, 2003).

O sistema neurotransmissor glutamatérgico está envolvido na formação, remodelamento e eliminação de sinapses (McKinney, 2010), migração neuronal (Manent & Represa, 2007), proliferação e diferenciação (Schlett, 2006) e morte celular (Vecino et al., 2004) e assim, na modulação de informações sensoriais, coordenação motora, emoções e cognição, incluindo a formação e aquisição de memória, além de dependência e tolerância a drogas (Braitenberg & Schüz, 1998; Carobrez, 2003; Nestler et al., 2002; Nascimento et al., 2006; Paul & Skolnick, 2003).

A formação do glutamato é um passo do metabolismo da glicose e de aminoácidos, sendo sintetizado de duas formas: a partir do α -cetoglutarato do ciclo de Krebs, pela enzima desidrogenase do ácido glutâmico ou a partir da glutamina, pela enzima glutaminase ativada por fosfato (McKenna, 2007). Como a captação de aminoácidos no cérebro é bem menor que de glicose, o grupamento amina do glutamato precisa ser reciclado. Uma importante reserva de grupamento amina para a síntese de glutamato é o aspartato, um aminoácido estruturalmente semelhante ao glutamato que também atua como neurotransmissor excitatório e tem afinidade seletiva pelo receptor glutamatérgico do tipo NMDA (descrito a seguir) (Kubrusly et al., 1998).

Além disso, o glutamato é constituinte de peptídeos e proteínas, como a glutatona, que protege as células contra estresse oxidativo (Fonnum, 1984), bem como precursor do ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório, em neurônios GABAérgicos e da glutamina em células gliais (Fonnum, 1984). No interior das células gliais, o glutamato retirado do espaço extracelular reage com amônia para formar glutamina, uma

reação importante para a retirada da amônia livre de dentro da célula (Laake et al., 1995). A glutamina, que não possui propriedades de neurotransmissor é, então, exportada para o meio extracelular e captada por neurônios, onde é reconvertida em glutamato. Esses mecanismos de movimentação do glutamato e da glutamina através de neurônios e células gliais são chamados de ciclo da glutamina (Van den Berg & Garfinkel, 1971).

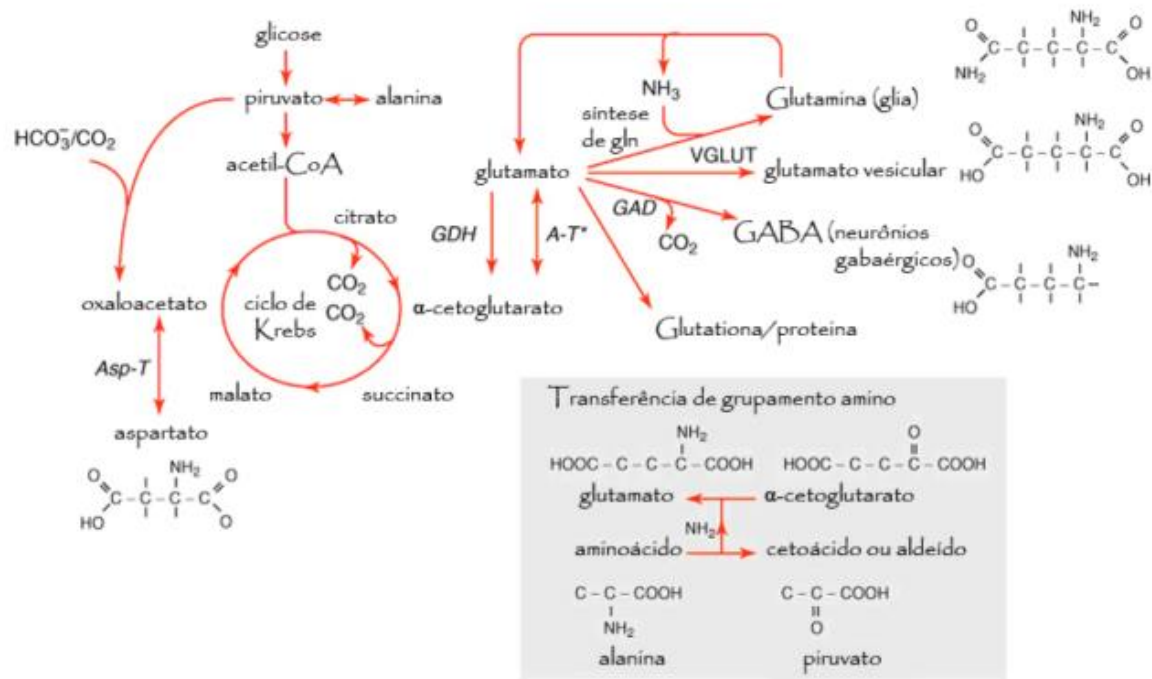


Figura 1. Vias de formação e destino do glutamato. Esquema da via glicolítica, ciclo de Krebs e formação de glutamato e aspartato, dois aminoácidos excitatórios, formados por vias diferentes. Posteriormente, o destino do glutamato é esquematizado nas diversas setas. Modificado de Hassel & Dingledine, 2006.

O glutamato é estocado em vesículas sinápticas. Proteínas especializadas na membrana vesicular, chamadas transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs), promovem o transporte do tipo antiporte próton/glutamato: a ATPase vesicular dependente de H^+ estabelece um gradiente elétrico de prótons através da membrana vesicular, com gasto de ATP, causando acúmulo de prótons no interior da vesícula e gerando o gradiente que promoverá a entrada e o acúmulo do glutamato (Moriyama et al., 1990; Tabb et al., 1992; Takamori, 2006). O glutamato vesicular é liberado na fenda sináptica através de um mecanismo de exocitose dependente de Ca^{2+} . As células neuronais, após estimulação, se despolarizam gerando um potencial de ação que se propaga por todo axônio até chegar ao terminal pré-sináptico, onde existem canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, que se abrem devido ao estímulo despolarizante. Esse influxo de Ca^{2+} resultante permite, então, a ligação e

fusão das vesículas contendo o neurotransmissor à membrana plasmática, liberando o glutamato para agir em seus receptores (Platt, 2007; Ueda, 1986).

Receptores glutamatérgicos

Genericamente, os receptores glutamatérgicos podem ser classificados como metabotrópicos, ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal via segundo mensageiro e ionotrópicos, cuja estrutura forma um canal iônico. Os receptores metabotrópicos são complexos proteicos que ligam funcionalmente os meios extra e intracelulares e, quando ativados, modificam o metabolismo celular através de enzimas, incluindo moléculas de sinalização como as proteínas G (Bourne, 1997). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos são divididos em grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6-8) (Swanson et al., 2005) e têm sido relacionados ao controle de respostas emotivas, como ansiedade e depressão, assim como à atividade locomotora (para revisão: Machado-Vieira et al., 2009).

Os receptores ionotrópicos são canais catiônicos, formados por múltiplas subunidades funcionais, cuja abertura é causada pela ligação de um agonista. Estes receptores possuem três classes nomeadas de acordo com seu agonista farmacológico seletivo. São elas do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroximetil-4-isoxazolepropionico) e KA (cainato). A afinidade pelo glutamato é diferente entre esses receptores, sendo geralmente maior nos receptores do tipo NMDA, formados pelas subunidades NR1, NR2A-D e NR3A-B. Os receptores AMPA são formados pelas subunidades GluR1-4, enquanto que os receptores cainato são formados pelas subunidades GluR5-7, KA1 e KA2 (Hollmann & Heinemann, 1994; Ozawa et al., 1998; Swanson et al., 2005). A permeabilidade aos íons Ca^{2+} , Na^{+} e K^{+} pode ser modulada pela presença ou não de aminoácidos específicos, que variam de acordo com as subunidades, no interior de seus poros (Wollmuth et al., 1996). A abertura do poro e subsequente influxo de íons levam a mudanças na polarização da membrana bem como à ativação direta de vias de sinalização intracelular (Du et al., 2007).

A neurotransmissão excitatória rápida é atribuída aos receptores AMPA e KA e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente a íons Na^{+} e K^{+} . Os receptores NMDA são altamente permeáveis aos íons Ca^{2+} e respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias. Isto porque os receptores NMDA estão normalmente bloqueados por íons Mg^{2+} e não

funcionais quando não ligados à glicina, dependendo da excitação repetida das células através dos receptores AMPA para se tornarem ativados (Bliss & Collingridge, 1993; Colino & Malenka, 1993). A ativação do receptor NMDA leva um aumento rápido da concentração pós-sináptica de Ca^{2+} (Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo, 1993, 1994), que estimula o canal de liberação de Ca^{2+} no retículo endoplasmático e amplifica a sinalização (Alford et al., 1993; Harvey & Collingridge, 1992).

O influxo de Ca^{2+} através dos receptores NMDA estimula a atividade de proteínas cinase, enzimas reguladoras da fosforilação (Yamauchi, 2005) implicadas na potenciação de longa duração (LTP = *long-term potentiation*), descrita a seguir (Strack et al., 1997; Gardoni et al., 2001). As proteínas cinase CaMK (cálcio/calmodulina dependentes) e PKC (Ca^{2+} dependente) favorecem a fosforilação de diversos tipos de receptores de glutamato ativando-os (González & Robinson, 2004). A proteína cinase dependente de GMPc (PKG) é necessária nos primeiros minutos após a indução de LTP: induz o neurônio pré-sináptico a liberar mais glutamato e tem um importante papel funcional no reconhecimento de objetos (Furini, 2009; Zin, 2009), enquanto a PKA, dependente de AMPc e ERKs, é crucial na fosforilação de fatores de transcrição de DNA presentes no núcleo da célula cerca de 3 a 4h após o indução da LTP (Huang et al., 1994).

No entanto, a superestimulação dos receptores glutamatérgicos, particularmente dos receptores NMDA, através de níveis elevados de glutamato no meio extracelular pode levar a um quadro de excitotoxicidade com consequente morte neuronal. A lesão excitotóxica resulta da entrada excessiva de Ca^{2+} e Na^+ na célula através dos canais iônicos e pela ação suplementar da liberação de Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares, aumentando sua concentração no meio intracelular (Choi, 1987; Wada, 1997). Estes íons Ca^{2+} ativarão diversas rotas enzimáticas envolvidas com a morte neuronal, tais como as de lipases, proteases, fosfatases, nucleases, óxido nítrico, sintases ou endonucleases (Meldrum, 2000). Assim, o glutamato precisa ter sua ação sinalizadora encerrada.

Transporte de glutamato

Uma vez que o glutamato não possui uma enzima que a degrade no espaço extracelular, a manutenção da concentração do aminoácido na fenda sináptica é feita por transportadores de glutamato por meio de captação (Takahashi et al., 1997). A difusão passiva é capaz de contribuir para esse processo, mas, principalmente, em sinapses pequenas. Tanto neurônios

como células gliais expressam transportadores de glutamato e sua inibição leva a um aumento da concentração extracelular de glutamato, que pode desencadear excitotoxicidade e morte neuronal (Choi, 1992; Jabaudon et al., 1999; Danbolt, 2001). Algumas dessas proteínas capazes de transportar glutamato, presentes tanto em glia quanto em neurônios, estão presentes na membrana citoplasmática e intracelularmente (Danbolt, 2001; Hassel & Dingledine, 2006).

O transporte de baixa afinidade é sensível a D-Glutamato e a L-homocisteína e é independente de Na^+ (Benjamin & Quastel, 1976; Cox et al., 1977). Aparentemente, esse processo ocorre para suprir as necessidades metabólicas das células, mas ainda é pouco caracterizado. O principal sistema independente de Na^+ conhecido é o trocador glutamato-cistina, a forma oxidada de cisteína (Bannai & Kitamura, 1980, 1981; Cho & Bannai, 1990). Esse transporte utiliza o gradiente de glutamato através da membrana como força motriz para importação de cistina, que é utilizada na formação de glutathione reduzida (Cooper & Kristal, 1997; Dringen, 2000). A elevação da concentração extracelular de glutamato inibe a captação de cistina e pode ser um dos fatores que contribuem para o estresse oxidativo em situações que levam a um aumento de glutamato exógeno (Cho & Bannai, 1990; Murphy et al., 1989 e 1990).

Os transportadores de alta afinidade são chamados de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), promovem tanto o transporte de L- e D-glutamato quanto de L- e D-aspartato (Kubrusly et al., 1998), são dependentes de Na^+ e sensíveis à temperatura (para revisão, ver Danbolt, 2001). A captação é acoplada ao transporte de Na^+ e K^+ : o transporte de uma molécula de glutamato para dentro da célula é vinculado à entrada de três íons Na^+ e um H^+ e à saída de um íon K^+ (Nedergaard et al., 2002). O processo de transporte é reversível em qualquer etapa e pode acontecer em todas as direções (Kanner & Marva, 1982).

As cinco isoformas conhecidas até o momento: GLAST (*glutamate-aspartate transporter*), encontrado em roedores e análogo ao EAAT1 de humanos (Storck et al., 1992) e GLT-1 (*glutamate transporter*), em camundongos, análogo ao EAAT2 de humanos (Pines et al., 1992), ambos encontrados em astrócitos associados a contatos excitatórios. O transportador mais amplamente distribuído no cérebro é o EAAC1 (*excitatory amino acid carrier*) (ratos) / EAAT3 (humanos). Encontrado em regiões não-sinápticas, inicialmente, assumia-se que era restrito a neurônios (Kanai & Hediger, 1992), no entanto, estudos posteriores demonstraram a presença deste transportador em astrócitos corticais e subcorticais (Conti et al., 1998) bem como em oligodendrócitos em diferentes regiões subcorticais (Domercq & Matute, 1999; Domercq et al., 1999; Kugler & Schmitt, 1999). Além destes, há

ainda o EAAT4, expresso seletivamente nas células GABAérgicas, como nas células de Purkinje (Fairman et al., 1995) e o transportador EAAT5, dependente de Cl^- (Danbolt, 2001), localizado nos neurônios da retina (Anderson et al., 2001; Arriza et al., 1997).

Os transportadores de aminoácidos excitatórios influenciam a ativação dos receptores glutamatérgicos NMDA e também podem estar implicados na modulação da plasticidade sináptica (Brasnjo & Otis, 2001; Huang & Bergles, 2004). Estudos feitos com camundongos *knockout* para os genes de EAATs demonstraram um aumento de morte por epilepsia espontânea, maior susceptibilidade à lesão cortical aguda e falha na realização de tarefas simples (Amara & Fontana, 2002). Além disso, alterações na expressão dos transportadores EAAT3/EAAC1 (Levenson et al., 2001) e GLT-1/EAAT2 (Katagiri et al., 2001) afetam mecanismos celulares de formação de memória.

Hipocampo e Memória

Memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, armazenado e posteriormente recuperado (Kandel, 2000). A memória também é definida como sendo uma fase da aprendizagem, que, por sua vez, é dividida em três etapas: (1) aquisição; (2) retenção por um dado período de tempo e (3) recordação (Sargent & Stafford, 1965). Ou ainda, memória significa aquisição (aprendizagem), formação, conservação e evocação (recuperação, recordação) de informações (Izquierdo, 2011).

A memória pode ser classificada levando em consideração o seu conteúdo: sendo ela explícita/declarativa, quando relacionada a fatos e eventos autobiográficos (memória episódica) ou a conhecimentos gerais (memória semântica) ou implícita/não-declarativa quando relacionada a habilidades sensoriomotoras (memória de procedimentos ou procedual). Outra classificação leva em consideração o tempo em que as informações ficam disponíveis: pode durar de poucos segundos a breves minutos (memória de trabalho), horas (memória de curta duração), pode durar dias, meses, anos (memória de longa duração) ou mesmo décadas (memória remota) (Izquierdo, 2011; Kandel, 2000).

O mapeamento anatômico e funcional da memória foi proposto para os diferentes tipos de memória, como para a memória declarativa (Squire, 1992; Eichenbaum & Cohen, 2001), a memória episódica (Tulving, 1983; Mishkin et al., 1997; Morris & Frey, 1997; Vargha-Khadem et al., 1997; Aggleton & Brown, 1999) e a função espacial e cognitiva (O'Keefe & Nadel, 1978; Gaffan, 2001). Fundamentalmente, os processos mnemônicos dependem da

integração de estruturas neurais (córtices cerebrais, estruturas hipocampus, amígdala, hipotálamo, estruturas mesencefálicas, entre outras), cada qual especializada em um ou mais tipos de memória. Pertencente ao sistema límbico, dentre outras funções, como a resposta ao estresse (Lathe, 2001), o hipocampo desempenha importante papel na consolidação da memória de curto e longo-prazo e na orientação espacial (Altman, 1962; Bliss & Collingridge, 1993; Morris et al., 1986; O'Keefe & Dostrovsky, 1971; Riedel & Micheau, 2001) de forma que a plasticidade sináptica nesta região tem sido amplamente estudada.

A formação hipocampal é uma estrutura cerebral bilateral e simétrica, composta de substância cinzenta, localizada em toda extensão do assoalho do corno do ventrículo lateral no lobo temporal medial, como pode ser visto na Figura 2 a seguir (Machado, 2006) e compreende quatro regiões corticais: o giro dentado, o hipocampo propriamente dito, o complexo subicular e o córtex entorrinal. O giro dentado é dividido nas camadas molecular (contínua ao hipocampo propriamente dito), granulosa (formada por neurônios ovais / esféricos densamente compactados, chamados de células granulosas) e polimórfica, por onde passam os axônios das células granulosas terminando nos dendritos das células piramidais no hipocampo, enquanto o hipocampo propriamente dito é dividido nos subcampos CA1, CA2 e CA3 (Amaral & Lavenex, 2007).

Os circuitos anatômicos da formação hipocampal incluem: aferências do córtex entorrinal para o giro dentado (via perfurante); das células granulares do giro dentado projetando, através das fibras musgosas, para a região hilar e subcampo CA3; projeções de CA3 para a região CA1; de CA1 de volta ao córtex entorrinal. Das células piramidais de CA1 emergem colaterais axônicas que terminam em neurônios de CA3 vias conexões de associação e também proporcionam a maior aferência para os neurônios piramidais de CA1 (via colateral de Schaffer) (Leite & Cavalheiro, 1998; Best, 1990), como esquematizado na Figura 2 abaixo.

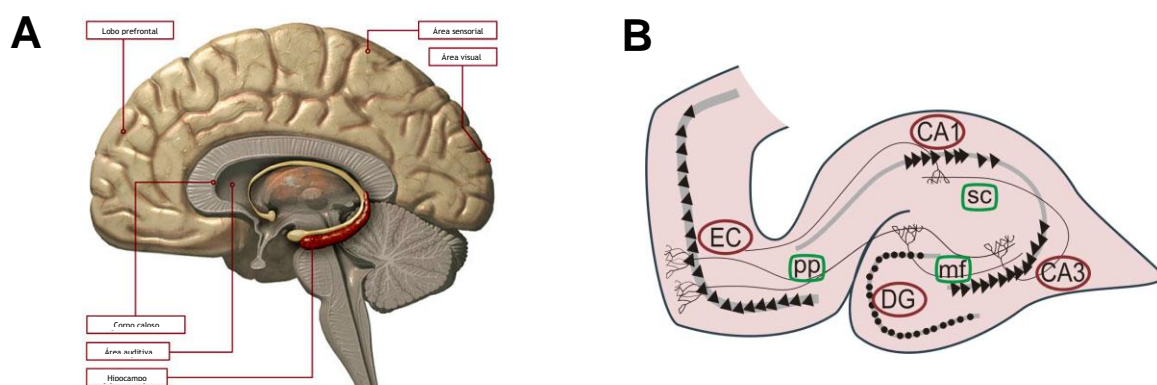


Figura 2A. O hipocampo anatomicamente posicionado em relação ao cérebro (Disponível em: <http://profmjvasconcelos.blogspot.com/2010/05/sesta-ajuda-memoria-recuperar.html>). Figura 2B. O hipocampo representado esquematicamente em corte coronal. Regiões CA1 e CA3 do hipocampo, DG = giro dentado, sc = via colateral de Schaffer, EC = córtex entorrinal, mf = fibras musgosas, pp = via perfurante. Os triângulos representam os neurônios piramidais e os círculos, os neurônios ovais ou esféricos. (Disponível em: <http://www.dei.brain.riken.jp/brainbox/uploads/images/hipp0-regions.jpg>).

Tem sido proposto que a neurogênese hipocampal, que ocorre majoritariamente no início do desenvolvimento e estende-se até o envelhecimento, se dá na zona subgranular do giro dentado (Altman, 1962; Eriksson et al., 1998; Gross, 2000). As células recém-formadas migram para a camada granulosa e diferenciam-se em células gliais ou neurônios, estes últimos enviam seus axônios para fora dessa camada em direção às fibras musgosas seguindo para a região CA3 e os dendritos seguem para a camada molecular (Hastings & Gould, 1999; Markakis & Gage, 1999; Stanfield & Trice, 1988; Van Praag, 2002). A neurogênese hipocampal é uma forma de se adaptar a novas e mais complexas situações (Kempermann, 2002), desempenhando um papel importante na formação de memória mediada pelo hipocampo (Shors et al., 2001, Van Praag et al., 1999).

Por sua vez, a neuroplasticidade é uma resposta fisiológica do sistema nervoso a estímulos endócrinos, ambientais, lesões ou drogas, que se dá através de alterações funcionais e/ou morfológicas nos neurônios (Ferrari et al., 2001; Maren & Baudry, 1995). Dentre os modelos de plasticidade neural – regeneração, plasticidade axônica, dendrítica, somática e sináptica (Oda et al., 2002), destacamos a potenciação e a depressão de longa duração (LTP = long-term potentiation e LTD = long-term depression, respectivamente). Os mecanismos celulares de LTP e LTD implicam, respectivamente, no aumento e na diminuição da eficácia de transmissão sináptica (Malenka & Nicoll, 1999) como forma de as redes neurais se adaptarem às suas atividades (Bliss & Lomo, 1973).

Funcionalmente, a LTP é um modelo celular de formação de memória (Morris et al., 1986; Bliss & Collingridge, 1993) que se dá, como descrito anteriormente, através da ativação

de receptores NMDA (Hirsch & Crepel, 1992; Law-Tho et al., 1995; Otani et al., 1998). De fato, a LTP apresenta propriedades relacionadas à memória, como a indução rápida (aquisição), uma grande labilidade no período pós-indução precoce (consolidação), mantém-se por longos períodos mesmo na ausência de estimulação e responde rapidamente quando há reexposição ao estímulo original (Baudry & Massicotte, 1992; Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo, 1994; Reymann, 1993).

Apontada como um substrato celular de memória no hipocampo (Adriani et al., 2004; Bortolotto et al., 1999; Hebb, 1949), a LTP já foi descrita no giro denteado (Bliss & Collingridge, 1993) e na subregião CA1 do hipocampo (Andersen et al., 1977; Reymann & Frey, 2007) – regiões largamente estudadas na tentativa de se compreender os mecanismos de formação de memória no hipocampo (Adriani et al., 2004; Bortolotto et al., 1999; Gruart et al., 2007; Hebb, 1949; Izquierdo et al., 2006; Izquierdo & Medina, 1997; Morris, 2003; Morris et al., 1986; Reymann et al., 1988), particularmente, da memória visuoespacial (Morris et al., 1986; 2003; Martin et al., 2000; Morris, 2003). De fato, a LTP apresenta elementos moleculares e mecanismos importantes à formação da memória visuoespacial (Lynch, 2004).

Em humanos, a habilidade visuoespacial diz respeito à capacidade de produzir, registrar, recordar e transformar imagens e/ou sensações visuais (Primi, 2003; Schelini, 2006). Tal habilidade pode ser aferida tanto por tarefas que envolvam a percepção e a transformação de formas e figuras (por exemplo, manipular mentalmente as características físicas dos estímulos, tais como a forma, a cor e o movimento) como por também pela manutenção da orientação espacial relativa a objetos, que envolve visualização, estabelecimento de relações espaciais e memória visual (McGrew, 2009). Inúmeros estudos em roedores têm avaliado a memória visuoespacial através de diferentes testes de labirinto. O labirinto aquático de Morris (Morris et al., 1984) vem sendo largamente utilizado ao longo das últimas três décadas (Filgueiras et al., 2010; Grant et al., 1992; Scerri et al., 2006; Whishaw et al., 1987) como uma importante ferramenta para melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos e estruturais (Burwell et al., 2004; Cain et al., 2006; Dash et al., 2004; Harker & Whishaw, 2004) envolvidos neste comportamento. No entanto, ainda são muitas as questões não respondidas relativas às alterações neurobiológicas no hipocampo ao longo do desenvolvimento.

Adolescência – aspectos neurobiológicos e comportamentais

A adolescência, descrita como a transição entre a infância e a idade adulta (Spear, 2000), é um período crítico do desenvolvimento comum a humanos e mamíferos de outras espécies, como roedores (Adriani, 2002, 2004). Além do ganho de massa e altura puberais e a maturação sexual (para revisão: Terasawa & Fernandez, 2010), na adolescência ocorrem alterações comportamentais (Andersen, 2003; Arnett, 1999; Doremus et al., 2003; Volkow & Li, 2005), endócrinas (Grumbach, 1975; Spear, 2002) e neurobiológicas (Plant & Barker-Gibb, 2004) marcantes que são determinantes para a vida adulta.

Cronologicamente, não se pode definir com precisão o começo e o término da adolescência. Esta janela do desenvolvimento varia consideravelmente (Dubas, 1991), de modo que tal critério, isoladamente, é impreciso e insuficiente. Em humanos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, este processo pode compreender quase toda a segunda década de vida (OMS, 1975), mais particularmente, o período entre os 12 e os 18 anos de idade (Estatuto da Criança e do Adolescente – ECA, 1990; Spear, 2000). O período de idade em torno da adolescência é denominado periadolescência (Spear & Brake, 1983). Há ainda a descrição de uma adolescência tardia, que se estende aos 25 anos de idade (Baumrind, 1987). Em macacos, a adolescência ocorre entre o 24º e o 48º meses de vida (Lewis, 1997; Rowell, 1977). Em camundongos, a adolescência também pode ser dividida em fases: precoce [dia pós-natal (PN) 24 a 35], média (PN 37 a 48) e tardia (PN 50 a 61) (Adriani et al., 2002), contudo, alguns autores consideram que a adolescência ocorre propriamente entre PN28 e PN42 (Spear, 2000) e que, em PN56, o animal se encontra na fase adulta jovem (Andersen, 2003; Spear, 2000). Outros grupos de pesquisa consideram o período de PN30 a PN45 (Abreu-Villaca et al., 2006, 2007; Oliveira-da-Silva et al., 2010; Ribeiro-Carvalho et al., 2009; Slotkin & Seidler, 2009).

O desenvolvimento do SNC, que se inicia no período pré-natal, estende-se até a adolescência e somente estabiliza na idade adulta (Spear, 2000). Na adolescência, ocorre um intenso rearranjo sináptico, que se dá por meio de proliferação neuronal e apoptose, em diversas regiões cerebrais (Altman & Bayer, 1990; Bayer, 1983; Bayer et al., 1982; Hodges et al., 1991; Hogg, 1996; Huttenlocher, 1990; McWilliams & Lynch, 1983; Spear, 2000). De fato, o processo de maturação neuronal em adolescentes humanos é não-linear e heterogêneo. O volume da substância cinzenta, em crescimento até a periadolescência, diminui entre a puberdade e a fase adulta jovem (Giedd et al., 1996; Pfefferbaum et al., 1994; Sowell et al., 1999) e sua maturação se inicia nas áreas sensório-motoras primárias para, então, estender-se

aos córtices frontal, parietal e occipital e por último, ao córtex temporal (Gogtay et al., 2004). Contudo, as diferenças mais marcantes entre o desenvolvimento cortical de adolescentes e adultos são encontradas no lobo frontal, onde há um declínio considerável no volume do córtex pré-frontal (CPF) tanto em humanos (Huttenlocher, 1979; Sowell et al., 1999, 2001b) quanto em primatas não-humanos (Bourgeois et al., 1994; Anderson et al., 1995) ou em roedores (Van Eden et al., 1985; Markham et al., 2007).

Dentre as reorganizações sinápticas ocorridas no CPF, as projeções dopaminérgicas, que se desenvolvem até a idade adulta jovem, com níveis mais altos de dopamina nesta região durante a adolescência também em primatas não-humanos (Rosenberg & Lewis, 1994) e ratos (Kalsbeek et al., 1988) têm particular relevância, uma vez que as sensações de prazer decorrentes do consumo de drogas, que podem implicar em dependência, são, fundamentalmente, promovidas pela via dopaminérgica mesocorticolímbica (Berke & Hyman, 2000; Di Chiara et al., 2004; Everitt & Wolf, 2002; Hyman & Malenka, 2001; Koob & Le Moal, 2001). Além disso, outras estruturas do sistema límbico, como a amígdala, o núcleo acumbens, o hipotálamo e o hipocampo, envolvidas nas respostas emocionais, cognitivas e diretamente implicadas nos mecanismos de abuso e dependência de drogas (Koob, 1992), encontram-se em intensa reorganização durante a adolescência (Crews et al., 2007), quando há um incremento dos níveis de receptores dopaminérgicos no corpo estriado (Teicher et al., 1995), bem como um aumento drástico dos níveis de dopamina no núcleo acumbens durante a adolescência (Blum et al., 1990).

Em oposição ao aumento dos impulsos dopaminérgicos, serotoninérgicos (Kalsbeek et al., 1988 tem no texto 1998; Rosenberg & Lewis, 1994), gabaérgicos (Blum et al., 2000) e de neurônios colinérgicos em ratos (Gould et al., 1991) e em humanos (Kostovic, 1990), há uma diminuição significativa de conexões glutamatérgicas no CPF tanto em humanos quanto em primatas não-humanos (Huttenlocher, 1984; Zecevic et al., 1989). De fato, a maturação do principal sistema neuroexcitatório do SNC, com um importante papel na resposta a psicoestimulantes e fundamental para os processos de aprendizagem e memória (Trujillo & Akil, 1995), também é consolidada durante a periadolescência (McDonald et al., 1990). Em roedores, os receptores ionotrópicos glutamatérgicos do tipo NMDA atingem seu pico no início da adolescência seguido de um declínio significativo de $\frac{1}{3}$ destas conexões até a idade adulta (Insel et al., 1990; Guilarte, 1998). No núcleo acumbens, há uma perda dos *inputs* excitatórios glutamatérgicos (Frantz & Van Hartesveldt, 1999a) com redução dos receptores NMDA nesta região durante a adolescência (Frantz and Van Hartesveldt, 1999b).

Outras regiões cerebrais, como hipotálamo e hipocampo de roedores (Dumas & Foster, 1998; Wolfer & Lipp, 1995) e humanos (Benes, 1989), também evidenciam o processo de maturação glutamatérgica. No hipotálamo de ratos, a atividade da glutamina é maior após a puberdade que no período pré-púbere, refletindo um aumento da sinalização glutamatérgica em neurônios que regulam o hormônio liberador de gonadotrofina, imprescindível à maturação dos caracteres sexuais secundários (Bourguignon et al., 2000). No hipocampo, ocorre ainda exuberante neurogênese e um aumento da densidade dendrítica no período pré-púbere que em adulto (He & Crews, 2007; Swann et al., 1999; Yildirim et al., 2008), com um aumento sexo-dependente do volume hipocampal durante o processo de maturação (Durstun et al., 2001; Koshibu et al., 2004; Yildirim et al., 2008).

De fato, mudanças estruturais em regiões implicadas em habilidades cognitivas podem estar correlacionadas ao desempenho deste tipo de tarefa (Casey et al., 2000; Gogtay et al., 2004; Luna et al., 2001; Sowell et al., 2001a). Humanos e macacos pré-púberes não alcançam o mesmo nível de desempenho de indivíduos adultos em tarefas CPF-dependentes, como a resposta a tarefas que exijam atenção seletiva (Levin et al., 1991; Casey et al., 2000). O mesmo se aplica a ratos (Altemus & Almli, 1997), cujas diferenças sexo-dependentes nas habilidades cognitivas emergem na puberdade (Kanit et al., 2000). Igualmente, para tarefas de aprendizado e memória hipocampo-dependentes, o desempenho de adolescentes e adultos é diferenciado: embora ratos pré-púberes pareçam desempenhar tais tarefas como um adulto jovem (Vorhees et al., 2005), despendem um tempo maior para executá-las (Brown et al., 2005), bem como as diferenças sexo-relacionadas em tarefas visuo-espaciais também são evidenciadas na puberdade (Kanit et al., 2000). De fato, o adolescente difere neurobiologicamente de um adulto de tal forma que seu cérebro realiza tarefas com mais dificuldades que o cérebro adulto (Luna et al., 2001). Assim, pode-se supor que o cérebro do adolescente seja ainda mais vulnerável a efeitos deletérios de agentes externos como as drogas de abuso, quando comparado a outros períodos do desenvolvimento.

Na adolescência, humanos e animais de várias espécies exibem um comportamento característico que os difere de indivíduos em outras fases do desenvolvimento (Spear, 2000). Roedores adolescentes exibem um aumento da busca por novidades (Adriani et al., 1998; Spear et al., 1980; Spear, 2000) e por situações de risco (Macri et al., 2002), bem como uma redução da resposta ao stress (Adriani & Laviola, 2000). Em roedores e primatas não-humanos, as mudanças comportamentais da adolescência incluem ainda um aumento da interação social com outros animais (Primus & Kellogg, 1989; Spear, 2000).

Na espécie humana, o adolescente depara com questões cruciais em sua vida relacionadas à formação da individualidade e da identidade adulta, como a autonomia ideológica e emocional da família (Spear, 2002) e a emancipação financeira (Organização Panamericana da Saúde, 2000). Também é nesta fase que o jovem passa por mudanças psicológicas profundas (Ernst et al., 2006) e inicia o processo de formação de grupos de pares, com os quais mantêm forte ligação (Spear, 2000), o exercício da sexualidade (Spinardi et al., 2008) e apresenta por comportamento característico a impulsividade, a labilidade emocional (Andersen, 2003; Teicher et al., 2003; Volkow & Li, 2005; Wallace et al., 2003), a intensa busca por novidades e comportamentos de risco (Spear et al., 1980; Spear, 2000). Diante deste contexto, em busca de novas formas de prazer e de aceitação pelo grupo (Bortoluzzi et al., 2008), o adolescente traz consigo uma maior suscetibilidade à experimentação (Abreu-Villaça et al., 2006; Bardo & Dwoskin, 2004) e ao uso abusivo de drogas (Andersen, 2003; Volkow & Li, 2005).

O consumo de drogas na adolescência

O uso de drogas de abuso frequentemente se inicia na adolescência (Elders et al., 1994; Johnston et al., 2001; Pierce & Gilpin, 1996). Jovens que observam amigos e parceiros durante o ato de fumar associam o cigarro à sensação de prazer, relaxamento e bem-estar, o que reforça seu desejo de experimentar a droga e contribui para aderirem ao hábito mais precocemente (Unger & Chen, 1999). O mesmo acontece em relação à bebida alcoólica (Mallett et al., 2006). Além disso, a desinibição promovida pelo álcool facilita a interação social entre jovens e é um grande encorajador para o consumo (Hunt et al., 2001; Varlinskaya et al., 2001; Varlinskaya & Spear, 2002). Há ainda uma pressão por parte dos grupos de pares que consomem bebida alcoólica e tabaco para que o adolescente experimente as drogas, contribuindo significativamente para que se torne usuário (Bobo & Husten, 2000; Little, 2000; Mallett et al., 2006).

Estudos mostram que o uso de substâncias psicoativas antes dos 15 anos de idade está fortemente associado ao desenvolvimento do abuso de tabaco, álcool e outras drogas na idade adulta (CDC, 2007; Grant, 1998a, b; Jaffe, 1995). Não obstante, o adolescente apresenta um perfil peculiar de consumo, sendo um poliusuário de drogas (Lucas, 2006; Pilon et al., 2005). Particularmente, o cigarro de tabaco e a bebida alcoólica são as substâncias psicoativas mais

utilizadas entre jovens (Galduróz et al., 2004; Johnston et al., 2001), com uma forte associação entre estas drogas na adolescência (CDC, 2007; Schmid et al., 2007).

O uso precoce de bebidas alcoólicas aumenta o consumo abusivo e prediz a dependência ao longo da vida (Grant, 1998a, b) de tal forma que seu consumo é contra-indicado até os 17-18 anos de idade (Hawkins et al., 1997). Entretanto, a média de idade para início do uso regular de bebidas é cada vez mais precoce (Laranjeira et al., 2007). Um estudo com jovens australianos mostra que a idade média para início do consumo é de 13,6 anos e que, em famílias cujos pais introduzem os filhos ao uso de álcool, a média cai para 12,8 anos (Copeland et al., 2005). Nos EUA, os jovens iniciam o uso de bebidas aos 13,1 anos de idade (United States Department of Health and Human Services – USDHHS, 1998) e cerca de 10,8 milhões de jovens norte-americanos com idade entre 12 e 20 anos relatam consumo de bebidas alcoólicas (USDHHS, 2004). Na Europa, o número de jovens com 13 anos de idade que já consumiu álcool pode chegar a 38% (Jernigan, 2001). No Brasil, a exposição a esta droga tem ocorrido ainda mais cedo: jovens entre 10 e 12 anos de idade já experimentam álcool e em média, aos 14,6 anos, um grande número de jovens já faz uso regular de bebida alcoólica (Laranjeira et al., 2007).

Situação igualmente alarmante se dá em relação ao consumo de tabaco por adolescentes: um estudo realizado em 2007 nos EUA mostra que o uso de cigarros de tabaco tem sido cada vez mais precoce, com seu início anterior ao ingresso no ensino médio: 50% dos estudantes deste segmento escolar já tinham experimentado cigarros. Em 2007, mais de 25% dos jovens com idade igual ou superior a 12 anos eram fumantes regulares, representando cerca de 71 milhões de jovens norte-americanos. Dentre todos os jovens que participaram deste estudo, 61% tentaram parar de fumar, mas apenas 12% obtiveram sucesso (CDC, 2007). No Brasil, o cigarro é a segunda droga mais consumida por adolescentes (Pinto & Ribeiro, 2007). Um estudo realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2004) com estudantes entre 13 e 15 anos de idade revela que $\frac{1}{3}$ experimentam cigarros de tabaco antes dos 12 anos e 75% dos adolescentes entrevistados têm livre acesso à droga.

Mais de 90% dos fumantes iniciam o hábito durante a adolescência (Chen & Millar, 1998; Pierce & Gilpin, 1996) sendo que $\frac{3}{4}$ destes adolescentes serão fumantes diários quando atingirem a idade adulta (National Institute on Drug Abuse, 1998; Nelson et al., 1995), além de sofrerem outros efeitos psicossociais deletérios. Infelizmente, apenas 3% dos adolescentes que fazem uso de cigarros acreditam que serão fumantes regulares em pouco tempo, quando, na realidade, a maior parte dos jovens que fuma regularmente já é vítima da adição à nicotina e apresenta sintomas de abstinência tal como os relatados por adultos (CDC, 2007).

Nicotina

O cigarro surgiu apenas no final do século XIX (Rosemberg, 2004) e rapidamente superou as demais formas de consumo de tabaco (Philip Morris, 2009). No entanto, a polêmica acerca do consumo é antiga: a primeira campanha governamental antitabaco ocorreu no início do século XVII e embora a questão do vício também já fosse abordada, apenas a partir da 2ª metade do século XX surgiram os primeiros relatórios médicos que reconheciam os prejuízos à saúde do fumante ativo e do fumante passivo e a dependência à nicotina causada pelo cigarro (Philip Morris, 2009; Souza Cruz, 2009).

Atualmente, há mais de 1 bilhão de fumantes no mundo, com 80% da população tabagista vivendo em países em desenvolvimento – cerca de 25 milhões destes fumantes estão no Brasil. Quanto aos fumantes passivos, este número duplica. Estima-se que 20 bilhões de cigarros sejam fumados diariamente no mundo, com um consumo de 200 toneladas de nicotina por dia (Rosemberg, 2004). A dependência é estabelecida quando o indivíduo mantém-se fumando a despeito dos malefícios provocados pelo hábito de fumar (American Psychiatric Association, 1994). Além da dependência, incluída na Classificação Internacional de Doenças da OMS (1993), o cigarro pode causar muitos outros graves prejuízos à saúde, como neoplasias e doenças respiratórias crônicas, e ainda ser um dos grandes fatores de risco das doenças coronarianas e acidentes vasculares cerebrais. Há ainda outras patologias relacionadas ao tabagismo, como a osteoporose e a impotência sexual masculina, com uma maior prevalência em fumantes (Ministério da Saúde – INCA, 2003). Anualmente, morrem cerca de 3 milhões de pessoas vítimas do tabaco. Se tal tendência se mantiver, a OMS estima que o número de morte/ano devido à exposição ao tabaco chegue aos 10 milhões nos próximos 30 anos. No Brasil, o cigarro mata precocemente cerca de 8 brasileiros/hora (Rosemberg, 2004).

Há cerca de 4.500 substâncias presentes no cigarro, várias delas tóxicas e/ou aditivas (Rosemberg, 2004). Assim, mesmo um baixo consumo de cigarros (até 4 por dia) pode levar a graves problemas de saúde e aumentar as chances de morte precoce (CDC, 2007). Dentre estas substâncias, a nicotina é considerada a principal substância neuroativa e apontada como responsável pela adição ao tabaco em todas as suas formas (Royal College of Physicians, 2000). Com isso, em poucos dias de fumo ocasional, o adolescente já pode apresentar sintomas de dependência (DiFranza et al., 2000; O'Loughlin et al., 2002) de tal forma que o tabagismo é considerado doença pediátrica provocada pela nicotina (Taioli e Wynder, 1991).

A nicotina, uma amina terciária volátil, é liberada na queima do cigarro e absorvida pelos pulmões. Com uma rápida difusão pela barreira hematoencefálica (Buisson & Bertrand, 2001), a nicotina atinge o cérebro em segundos (Benowitz, 1988) e seus efeitos no SNC e demais sistemas dependem da dose e da frequência utilizadas (Henningfield & Keenan, 1993). O pico plasmático desta substância é atingido em 5 minutos e declina rapidamente, em apenas 12 minutos (Benowitz, 1988). Com uma meia-vida de aproximadamente 2 horas em seres humanos, apenas 5% da nicotina são excretados em sua forma original pelos rins: sua metabolização ocorre majoritariamente no fígado (USDHHS, 1988). A cotinina, seu metabólito principal na maioria dos mamíferos, incluindo humanos e roedores (Hukkanen et al., 2005), vem sendo largamente utilizada como um marcador da exposição ativa ou passiva à nicotina (Blackford et al., 2006; Zevin et al., 2000) por ter uma maior meia-vida (20 horas) e por ser suficientemente sensível para detecção em fluídos corporais – usualmente, sangue, urina e saliva (Binnie et al., 2004; Vine et al., 1993; Poppe et al., 1995). A enzima CYP2A6 do citocromo P450 tem sido demonstrada como a enzima primariamente responsável pelo metabolismo da nicotina em humanos (Hukkanen et al., 2005).

Aspectos neurobiológicos da nicotina

A nicotina é um estimulante leve do SNC. Inicialmente, promove alterações de humor, tontura e náusea, com uma diminuição progressiva da percepção destes sintomas com a persistência do consumo, o que constitui o quadro de tolerância à droga e permite o aumento na frequência do uso do cigarro (Rosemberg, 2004). A nicotina promove ainda um discreto aumento do estado de alerta e diminuição do apetite (Heishman et al., 1993; Haxby, 1995) e a manutenção das concentrações plasmáticas de nicotina faz-se necessária para que o fumante não sofra os sintomas de abstinência da droga, dentre eles diminuição da concentração (Jacobsen et al., 2005), irritabilidade, ansiedade, cefaléia, alterações de humor e aumento do apetite (CDC, 2007). Desta forma, 50% dos jovens fumantes desejam parar de fumar sem sucesso (OMS, 2002c).

Estudos em animais têm mostrado que a nicotina atua centralmente através de receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs), amplamente distribuídos no SNC (Buisson & Bertrand, 2001; Domino, 1998; Wang & Sun, 2005), dada sua semelhança estrutural à acetilcolina (Balfour, 1982). Desta forma, os receptores nicotínicos atuam como mediadores primários dos efeitos desta droga no cérebro (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004; Falk et al.,

2006; Wonnacott, 1997). A nicotina ativa os nAChRs, localizados no córtex cerebral, cerebelo, em algumas estruturas mesencefálicas, hipocampo e outras regiões (Domino, 1998; Wang & Sun, 2005).

A nicotina atua como um modulador de outros sistemas neurotransmissores (Aramakis & Metherate, 1998; Chiodini et al., 1999; Levin & Simon, 1998; Miledi, 1980; Wonnacott, 1997; Yin & French, 2000). A ativação dos nAChRs medeia uma liberação adicional de dopamina em regiões mesencefálicas (Dani & De Biasi, 2001; Lajtha, 2008; Wonnacott et al., 2000; Zhou et al., 2001), bem como no córtex pré-frontal (Tsukada et al., 2005), áreas diretamente envolvidas com mecanismos de recompensa e reforço (Lebargy, 2003) e fundamentais na promoção do mecanismo de adição tanto pela nicotina como por outras drogas de abuso (Balfour et al., 2000; Janhunen & Ahtee, et al., 2007). Tal estimulação pré-sináptica de nAChRs aumenta ainda a liberação de outros neurotransmissores no hipocampo de ratos, como a própria acetilcolina (Araujo et al., 1988; Toide & Arima, 1989; Wilkie et al., 1996), noradrenalina (Clarke & Reuben, 1996; Sacaan et al., 1996; Sershen et al., 1997), GABA (Alkondon et al., 1997, 1999) e serotonina (Rao et al., 2003; Kenny et al., 2000). O uso de nicotina na adolescência leva a um desenvolvimento subsequente de depressão e transtornos do sono (Fergusson et al., 1998; Trauth et al., 2000) causado por alterações da função serotoninérgica (Maes et al., 1995), dentre elas, uma redução de transportadores de serotonina, o que pode refletir uma perda de terminais nervosos ou alternativamente, uma supressão da expressão de um transportador específico em períodos críticos do desenvolvimento no sistema serotoninérgico (Xu et al., 2001).

Além disso, a nicotina afeta os mecanismos de atenção, aprendizagem e memória hipocampais através da modulação sináptica excitatória nesta região – a nicotina promove um aumento da transmissão glutamatérgica (McGehee et al., 1995; Gray et al., 1996) estimulando a liberação do glutamato (Fedele et al., 1998). Estudos sugerem que a estimulação glutamatérgica pela nicotina se dê através dos subtipos de nAChR $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$: uma vez que ambos são localizados no hipocampo e expressos nos terminais pré e pós-sinápticos, tais receptores modulariam a permeabilidade celular ao Ca^{2+} interferindo, assim, nos processos de plasticidade sináptica necessários à formação de memória (Barrantes et al., 1994, 1995; Broide & Leslie, 1999; Papke et al., 2001; Perry et al., 2002; Sorenson et al., 1998; Wonnacott, 1997).

Álcool / Etanol

A bebida alcoólica acompanha a história da humanidade com grande relevância cultural, econômica e religiosa (Vaillant, 1999) e está incorporada aos hábitos de vida diária da nossa sociedade (Bloomfield et al., 2003), sendo vinculada, na atualidade, a imagem de independência, maturidade, êxito profissional e social e erotismo, que atuam como um estimulante ao consumo (Pinsky & Pavarino Filho, 2007). No entanto, o consumo excessivo é altamente nocivo e tem repercussões multissistêmicas, tais como o aumento do risco para diabetes e doenças cardiovasculares, além de desencadear hepatites tóxicas, cirrose, amnésia alcoólica, polineuropatia alcoólica, entre outros (Bau, 2002), que atingiram níveis socialmente alarmantes e desencadearam esforços no sentido de se compreender melhor os efeitos deletérios à saúde (Jerome, 1993).

O consumo de álcool é a 3ª causa de mortalidade em países desenvolvidos: mata 2 milhões de pessoas ao ano (OMS, 2005). Além disso, tem sido apontado como uma grande causa de perdas econômicas à sociedade devido à queda da produtividade e da atividade no trabalho e aos custos com serviços de saúde, serviços sociais e justiça penal (Bau, 2002; OMS, 2002a). No Brasil, o consumo de álcool é a 3ª causa de absenteísmo no trabalho (Nascimento, 2004) e responsável por 40% dos acidentes nas empresas (Quaglia, 2004), bem como por 50% dos acidentes automobilísticos fatais (IML-SP, 1999).

O alcoolismo passou a ser tratado como doença somente em 1952, ao ser incluído na primeira edição do DSM-I (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) (Jerome, 1993). Em 1967, a OMS incorporou um conceito mais complexo da doença relacionada ao alcoolismo à Classificação Internacional das Doenças (CID-8) (OMS, 1994). Os problemas do alcoolismo foram categorizados em: dependência, episódios de beber excessivo (abuso) e beber excessivo habitual. A dependência foi caracterizada pelo uso compulsivo de bebidas alcoólicas e pela manifestação de sintomas de abstinência quando na cessação do uso de álcool (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism – NIAAA, 1995).

Atualmente, estima-se que mais de $\frac{2}{3}$ da população ocidental bebam mais do que ocasionalmente (Bau, 2002), sendo que cerca de 10% das pessoas que consomem bebida alcoólica desenvolvem quadro de dependência (Araújo & Gomes, 1998; Jernigan et al., 2001; Pechansky et al., 2004). De fato, cerca de 15% da população norte-americana preenche critérios diagnósticos para o abuso do álcool e 3-5% das mulheres e 10% dos homens preenchem critérios para dependência ao longo da vida (Kaplan et al., 1994). No Brasil, o consumo desta droga cresceu mais de 150% nas últimas décadas (OMS, 2004): 75% da

população entre 12 e 65 anos já tiveram algum tipo de contato com bebida alcoólica pelo menos uma vez na vida (Carlini et al., 2002) e 16 milhões de pessoas são dependentes do álcool no país (Secretaria Nacional Antidrogas, 2004).

Aspectos neurobiológicos do etanol

O álcool utilizado na fabricação de bebidas é o etanol ou álcool etílico, uma substância hidrossolúvel com rápida difusão pela barreira hematoencefálica (Goodman & Gilman, 2006; Scivoletto & Malbergier, 2003). Os efeitos agudos do uso do etanol podem variar, de acordo com a dose ingerida, de um estado de euforia e desinibição à agressividade ou à sonolência, confusão mental e desorientação (estágios iniciais de depressão do SNC), acompanhados ou não de episódios de amnésia alcoólica. Em estágios mais graves de intoxicação, o indivíduo pode chegar ao coma ou à morte (Goodman & Gilman, 2006). A metabolização primária do etanol ocorre no estômago, seguidamente, no intestino delgado e no fígado (Lieber, 2000). As variações na taxa de absorção do etanol dependem do tempo de esvaziamento gástrico e do início da absorção intestinal (Lieber, 2000; Scivoletto & Malbergier, 2003). Além disso, o pico plasmático da droga também é influenciado pelo sexo, massa e idade do indivíduo (SENAD, 2005).

O etanol altera seletiva e especificamente a função de várias proteínas ligadas à membrana e induz seus efeitos farmacológicos centrais através de diferentes sistemas neurotransmissores (Koob et al., 1998; Harris et al., 2008), atuando como um modulador de receptores ionotrópicos (El-Fakahany et al., 1983; Messing et al., 1986). O sistema gabaérgico, principal sistema neurotransmissor inibitório do SNC (Yogeewari et al., 2006), é um dos principais sítios de ação do etanol. A interação do álcool com receptores do tipo GABA_A é responsável pela mediação dos efeitos de sedação do etanol (Goodman & Gilman, 2006; Mihic & Harris, 1997), além de modular a liberação de dopamina mesocorticolímbica (Eiler & June, 2007).

Embora a liberação de dopamina no núcleo acumbens seja apontada como um dos principais mecanismos neuroquímicos de adição do etanol (Di Chiara et al., 2004; Diana et al., 1992; Kianmaa & Tabakoff, 1983), há estudos que enfatizam a atuação de outros sistemas neurotransmissores como mediadores dos efeitos de reforço (Edenberg & Kranzler, 2005; Larsson & Engel, 2004; Oroszi & Goldman, 2004) e reguladores da sensibilização ao álcool (Moore et al., 1998), tais como subunidades de receptores GABA e nAChRs (Edenberg &

Kranzler, 2005), receptores serotoninérgicos (Higley et al., 1996), opióides (Oroszi & Goldman, 2004) e glutamatérgicos (Gerdeman et al., 2003).

Os efeitos agudos do álcool modificam a transmissão glutamatérgica, através da inibição da resposta mediada pelo receptor NMDA (Hoffman, 1994). Particularmente, o álcool age como um inibidor deste receptor (Hollmann & Heinemann 1994; Lovinger et al. 1989) com consequente diminuição significativa da concentração de Ca^{2+} intracelular desencadeada pelo uso agudo do etanol (Vengeliene et al., 2008). Alguns estudos sugerem que a exposição crônica ao etanol leva a mudanças funcionais nestes receptores. Estudos demonstram que antagonistas NMDA, como o MK-801 e a quetamina, são capazes de inibir o desenvolvimento da tolerância ao etanol (Khanna et al., 1991, 1992a, 1992b, 1993) de modo que a suprarregulação dos receptores NMDA, além de promover hipersensibilidade ao etanol, pode estar implicada nos mecanismos de dependência desta droga (Nagy et al., 2005; Trujillo & Akil, 1995). Além disso, a retirada da droga após o uso crônico leva a uma ativação compensatória destes receptores (Gibson et al., 2003) e pode desencadear um quadro de excitotoxicidade. Funcionalmente, esta inibição excitatória glutamatérgica repercute em alterações de memória (Tsai & Coyle, 1998) – particularmente, a formação de memória no hipocampo via LTP é sensivelmente afetada pelo etanol em adolescentes (Adriani et al., 2004; Bortolotto et al., 1999; Swartzwelder et al., 1995a).

Nicotina e etanol: coabuso e interações funcionais

O alcoolismo é dez vezes mais frequente entre fumantes (Dawson, 2000; DiFranza & Guerrera, 1990), particularmente, entre os fumantes pesados (Bien & Burge, 1990; Batel et al., 1995). Fumantes bebem duas vezes mais do que os não fumantes (Carmody et al., 1985) e consomem mais cigarros por dia em comparação aos não-alcoólicos fumantes (Dawson, 2000). Além disso, indivíduos com transtornos decorrentes do abuso de álcool quando hospitalizados para desintoxicação mostram mudanças sistemáticas no seu comportamento tabagista: enquanto tabagistas pesados fumam menos, os moderados aumentam substancialmente o consumo de tabaco (Batra, 2000).

A coocorrência do consumo de bebida alcoólica e cigarros se estabelece ainda na adolescência (Carmody et al., 1985; Dawson, 2000; Di Franza & Guerrera, 1990; Grant, 1998; Larsson & Engel, 2004; Miller & Gold, 1998) e o consumo precoce destas drogas de abuso prediz a dependência ao longo da vida (CDC, 2007; Grant, 1998a). Talvez mais

importante, tanto a nicotina quanto o etanol podem afetar o desenvolvimento cerebral durante a adolescência (Slotkin, 2002; Spear, 2000).

Assim, o Laboratório de Neurofisiologia da UERJ vem desenvolvendo, desde 2005, uma série de estudos visando identificar os efeitos comportamentais, bioquímicos e morfológicos da exposição combinada a nicotina e etanol durante o período da adolescência em camundongos. Utilizando o mesmo modelo de exposição à nicotina e ao etanol do presente estudo, nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos destas drogas sobre a ansiedade (Abreu-Villaça et al., 2008), memória (Abreu-Villaça et al., 2007), neurotoxicidade (Oliveira-da-Silva et al., 2009, 2010) e sistema colinérgico (Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009).

Através do teste no labirinto em cruz elevado, modelo largamente utilizado na avaliação dos níveis de ansiedade, foi demonstrado que o etanol promove um efeito ansiolítico em camundongos adolescentes e que a nicotina pode revertê-lo. Inversamente, o efeito ansiogênico da interação entre as drogas foi observado mesmo após um longo período de retirada, com os animais já na idade adulta (Abreu-Villaça et al., 2008), o que, por sua vez, pode contribuir para recaídas ao uso de drogas. Uma interação entre as drogas também pode ser demonstrada na regulação da aprendizagem/memória. Usando o modelo de esQUIVA passiva, foi observado que, na adolescência, a associação de nicotina e etanol promove danos na memória significativamente maiores do que cada droga individualmente (Abreu-Villaça et al., 2007). Neste mesmo estudo, também se verificou que, após um curto período de retirada, a nicotina promoveu um aumento da capacidade cognitiva dos animais, contudo, este efeito foi bloqueado pelo uso concomitante do etanol.

Em relação à neurotoxicidade, recentemente, 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 a nicotina também causa aumento da morte celular, porém, em menor intensidade e de forma região-dependente. Neste estudo, também houve interação de efeitos quando as duas drogas foram ofertadas simultaneamente, contudo, neste caso, a dupla exposição promoveu efeitos menos severos na morte celular (Oliveira-da-Silva et al., 2009). Adicionalmente, com a retirada das drogas, houve uma redução compensatória da morte celular por apoptose o que causou redução dos efeitos na densidade neuronal e glial (Oliveira-da-Silva et al., 2010).

Ansiedade e aprendizagem/memória são comportamentos associados à função do sistema colinérgico. Adicionalmente, considerando que a nicotina é um agonista dos nAChRs e que o etanol interage com receptores ionotrópicos, incluindo os colinérgicos, o sistema colinérgico foi estudado visando o entendimento das bases neuroquímicas envolvidas nos

processos de co-uso e co-abuso. Desta forma, foi observado que a exposição combinada promoveu uma robusta suprarregulação de $\alpha 4\beta 2$ nAChRs no córtex cerebral e no mesencéfalo, destacando-se o efeito sinérgico das drogas sobre o mesencéfalo (Ribeiro-Carvalho et al., 2008). Considerando a importância dos circuitos mesencefálicos nos mecanismos de geração de recompensa e vício (Mansvelder & McGehee, 2002; Nestler, 2001) e o fato de que também se sugere que a suprarregulação dos nAChRs esteja envolvida no estabelecimento desses mecanismos (Buisson & Bertrand, 2002; Dani & De Biasi, 2001; Picciotto et al., 2008), sugerimos que, se o mesmo ocorresse em adolescentes humanos, o efeito sinérgico poderia facilitar a geração do abuso de ambas as drogas.

Também foi quantificada a atividade da colina acetiltransferase (ChAT), responsável pela biossíntese de acetilcolina. ChAT é um marcador constitutivo para os terminais colinérgicos, sendo utilizado para avaliar o padrão de inervação colinérgica (Aubert et al., 1996; Happe & Murrin, 1992; Navarro et al., 1989; Zahalka et al., 1993) e [3H]hemicholinium-3 (HC-3), um ligante de alta afinidade do transportador pré-sináptico de colina, reflete a atividade sináptica colinérgica (Klemm & Kuhar, 1979; Simon et al., 1976). Surpreendentemente, não foram encontradas alterações na atividade da ChAT durante a exposição combinada. Durante o curto período de retirada das drogas, foi observado que a exposição combinada promoveu aumento na atividade da ChAT, enquanto que após longo período de retirada (30 dias), a dupla exposição gerou diminuição da atividade da ChAT. Considerando que o aumento do número de terminais tem sido sugerido como uma resposta compensatória ao dano celular, é possível que haja dano celular durante a retirada de curto prazo e que este dano seja compensado. Contudo, após longo período de retirada, a diminuição da ChAT está associada à perda de inervação colinérgica, sugerindo que efeitos compensatórios são ineficientes. Assim, o referido estudo fornece evidência experimental de que a exposição combinada à nicotina e ao etanol promove perda da inervação colinérgica a longo prazo (Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009). Não houve diferenças na marcação do transportador pré-sináptico de colina pelo hemicolinium durante a exposição às drogas, contudo, verificamos uma pequena redução na magnitude da marcação após o final da exposição. Do mesmo modo, foi observada esta redução quando somente o etanol foi administrado. Desta forma, este resultado sugere que a coexposição gera redução da atividade colinérgica, muito provavelmente, devido à ação da retirada do etanol.

Os resultados descritos acima indicam que a nicotina e o etanol interagem durante a adolescência, causando grande variedade de alterações durante a exposição e após seu término. De fato, é bem documentado que adolescentes apresentam uma resposta peculiar à

nicotina (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004, 2007; Slotkin, 2002) e ao etanol (Barron et al., 2005; Sircar & Sircar, 2005) quando comparados aos adultos. Contudo, nicotina e etanol atuam em sítios comuns de ligação e interagem funcionalmente no SNC (Collins et al., 1996; Lê et al., 2003) mediando seus efeitos por outros sistemas neurotransmissores. Sobretudo, a compreensão dos mecanismos de interação nicotina-etanol através do sistema glutamatérgico, o maior sistema neurotransmissor excitatório do SNC (Al-Rejaie & Dar, 2006a), que representa cerca de 40% das sinapses em mamíferos e 80% da transmissão em regiões cerebrais envolvidas em processos cognitivos (Danbolt, 2001), é crítica no entendimento da vulnerabilidade do cérebro adolescente a estas substâncias.

A exposição aguda ao etanol prejudica a aprendizagem e a formação de memória (Givens et al., 2000; Markwiese et al., 1998; Rezayof et al., 2007): a neurogênese hipocampal no cérebro adolescente é altamente sensível às inibições induzidas pelo álcool (Crews et al., 2007), com prejuízos na LTP e função dos NMDARs nesta região (Swartzwelder et al., 1995a,b). Particularmente, os neurônios NMDA hipocampais apresentam uma sensibilidade ao etanol maior em adolescentes do que em neonatos (Marinelli et al., 2005) ou em adultos (Swartzwelder et al., 1995a,b; Li et al., 2002). Mudanças estruturais e funcionais durante a exposição crônica e a retirada do tratamento com etanol (Floyd et al., 2003) reforçam o envolvimento dos receptores NMDA como mediadores dos efeitos cognitivos deletérios do etanol. Por outro lado, enquanto a administração de nicotina na fase adulta melhora o desempenho cognitivo de humanos e roedores (Ernst et al., 2001; Hefco et al., 2004; Levin & Rezvani, 2000; Rezvani & Levin, 2003b), adolescentes fumantes têm um pobre desempenho em tarefas cognitivas (Jacobsen et al., 2005). A exposição aguda e crônica à nicotina reduz os efeitos citotóxicos do excesso de Ca^{2+} intracelular pela hiperativação do receptor NMDA (Akaike et al., 1994; Kaneko et al., 1997; Marin et al., 1994; Minaña et al., 1998; Shimohama et al., 1996). Este dado é particularmente relevante ao considerarmos a hiperexcitação dos receptores NMDA e dos canais de cálcio com efeitos tóxicos devido à exposição crônica (Bao et al., 2001; Chandler et al., 1999; Follesa & Ticku, 1995, 1996; Kalluri et al., 1998) e à retirada do etanol em humanos, (Freund & Anderson, 1996; Geretsegger & Fartacek, 1998; Tsai et al., 1998) e em roedores (Becker et al., 1998; Sanna et al., 1993).

Apesar das numerosas demonstrações, os efeitos cognitivos da nicotina e do etanol podem não ser atribuídos unicamente a alterações dos receptores NMDA. Uma vez que alterações na manutenção dos níveis extracelulares de glutamato, realizada por transportadores de aminoácidos excitatórios (Danbolt, 2001), também estão envolvidas em processos neuropatológicos (Maragakis & Rothstein, 2004), variações na captação de

glutamato e ação nos receptores sinápticos, podem contribuir significativamente para a indução dos efeitos cognitivos de nicotina e etanol. Talvez mais importante, apesar da interação nicotina-etanol na função cognitiva demandar maiores esclarecimentos, particularmente, no período crítico da adolescência, não há estudos em modelos animais que avaliem este tipo de resposta glutamatergica à nicotina e ao etanol, isoladamente e na co-exposição. Desta forma, este estudo tem por objetivo investigar os efeitos de nicotina e/ou etanol na adolescência em uma tarefa hipocampo-dependente e sua relação funcional com a atividade dos transportadores de aminoácidos excitatórios.

1 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo principal responder às seguintes questões: Há alterações de aprendizagem/memória associadas à exposição à nicotina ou ao etanol durante a adolescência? Estas alterações estão acompanhadas de alterações neuroquímicas? Há efeitos neurais específicos (sinérgicos ou antagônicos) na dupla exposição à nicotina e ao etanol? Estas questões foram abordadas através dos objetivos específicos:

- Objetivo específico 1. Investigar se há diferenças marcantes na memória visuoespacial associadas à exposição individual à nicotina ou ao etanol, bem como à exposição concomitante a estas drogas, durante a adolescência.
- Objetivo específico 2. Verificar se as alterações comportamentais persistem no período de retirada das drogas.
- Objetivo específico 3. Uma vez que o sistema glutamatérgico está diretamente implicado nos processos de formação de memória e que este sistema é um sítio de ação comum da nicotina e do etanol, verificamos o impacto da exposição a cada uma destas drogas, assim como da exposição combinada durante a adolescência visando responder as seguintes questões: Há alterações na captação de aminoácidos excitatórios? Até que ponto os efeitos da dupla exposição refletem a combinação dos efeitos individuais da nicotina e do etanol? As possíveis alterações nos níveis de captação de aminoácidos excitatórios estão associadas a alterações na atividade ou na expressão de EAATs?

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos adotados neste trabalho atendem às deliberações da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (número de protocolo CEA/30/2009), vinculada à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde) e foram desenvolvidos no Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (DCF/IBRAG/UERJ) com a colaboração do Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense.

2.1 Animais experimentais

Neste estudo, foram utilizados camundongos Suíços adolescentes de ambos os sexos. Todos os animais foram gerados, criados e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia do DCF/IBRAG/UERJ – temperatura controlada em torno de 21° C, ciclo de luminosidade de 12 horas (início do período escuro às 13h00min) – com livre acesso à comida e água.

O dia do nascimento foi considerado o 1° dia de vida pós-natal (PN1). As ninhadas foram reduzidas, após o nascimento, a um máximo de oito filhotes a fim de permitir suporte nutricional adequado a todos os animais. Caso houvesse um número superior a oito filhotes, os demais eram sacrificados. Em PN21, os animais foram desmamados e separados por sexo. Em PN29, os animais foram individualizados e designados para um dos grupos experimentais. A exposição à(s) droga(s) ocorreu do 30° ao 45° dia de vida pós-natal (PN30-PN45).

2.2 Distribuição dos animais por grupo experimental

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

Durante seu período de atividade, fumantes regulares tendem a fumar intermitentemente de forma a manter os níveis séricos de nicotina acima da concentração mínima efetiva (Palombini, 2001). Desta forma, escolhemos dar aos animais livre acesso à solução de nicotina, o que lhes permitiu o consumo da droga durante seu período ativo.

Nicotina (*free base* – 50µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dissolvida em sacarina a 2% foi ofertada como única forma de ingestão de fluido. Ao invés das tradicionais garrafas de água utilizadas para roedores, pipetas plásticas graduadas com capacidade para comportar 25 ml foram preenchidas com 20 ml de solução. A utilização das pipetas permitiu maior precisão na quantificação diária da ingestão de fluido. A solução da droga foi trocada diariamente ao longo dos 15 dias de tratamento.

Para melhor simular o consumo intermitente do álcool feito por adolescentes (Pascual et al., 2007; Tokunaga et al., 2006; White et al., 2000), uma solução de etanol a 25%, diluída em salina (v/v) (2g de etanol/Kg de massa corporal do animal) foi administrada através de injeções via intraperitoneal (i.p.). A primeira injeção foi aplicada no primeiro dia de tratamento (PN30) e, a partir de então, em dias alternados até o final do período de exposição à droga. Desta forma, a última injeção foi administrada em PN44. Este desenho experimental implicou em, durante o período de exposição na adolescência, a cada 48 horas, os camundongos terem apresentado um período de intoxicação pelo etanol seguido de um período de retirada (Parnell et al., 2006).

2.2.2 Grupo exposto à nicotina (NIC)

Nicotina (*free base* – 50µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dissolvida em sacarina a 2% foi ofertada na pipeta plástica graduada como descrito acima. Para submeter todos os grupos às mesmas condições de estresse, os animais deste grupo experimental também receberam injeções de salina (i.p.) em dias alternados de acordo com a massa do animal, tendo sido a primeira em PN30 e a última em PN44.

2.2.3 Grupo exposto ao etanol (ETOH)

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

2.2.4 Grupo controle (VEH)

Submetidos às mesmas condições de manipulação e estresse, além da solução de sacarina a 2% em uma pipeta contendo 20 ml de líquido, o grupo controle também recebeu injeções de solução salina i.p. em dias alternados.

O estudo completo do impacto da exposição à nicotina e ao etanol durante a adolescência constou de um total de 375 camundongos provenientes de 48 ninhadas: 189 animais destinados aos testes comportamentais e 186 outros às análises bioquímicas. A distribuição dos animais é detalhada após a descrição de cada experimento.

2.3 **Tratamento**

2.3.1 Administração de nicotina e etanol e medidas de massa corporal e ingesta de líquido

Os animais foram individualizados um dia antes do início do tratamento, (PN29), quando tiveram sua garrafa de água substituída por uma pipeta contendo 20 ml de água de modo que a ingestão da droga não fosse afetada pela adaptação do animal à conformação da pipeta.

No primeiro dia de tratamento (PN30), entre as 11h00min e 13h00min, cada animal foi levado em sua gaiola para a sala de Análise Comportamental do Laboratório de Neurofisiologia, localizada ao lado do biotério, onde foi pesado em uma balança. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção (i.p.) de etanol ou salina de acordo com sua massa. Após a injeção, o animal foi recolocado em sua gaiola e levado de volta ao biotério, onde recebeu a pipeta contendo 20 ml de solução de nicotina ou de sacarina, de acordo com o grupo experimental a que pertencesse.

Diariamente, a quantidade de líquido ingerida pelos animais foi quantificada e as soluções remanescentes descartadas. Para desconsiderar um eventual vazamento da solução nas pipetas e não atribuir um valor de ingestão equivocado, uma pipeta com 20 ml de solução de sacarina foi colocada em uma caixa vazia (“branco”) de modo que o valor de líquido vazado no “branco” foi subtraído da medida de ingestão relativa àquele dia.

Após a quantificação da ingestão de líquido, todo o procedimento do primeiro dia de tratamento foi reproduzido, à exceção da injeção, que se dava em dias alternados a partir de PN30. Em seguida, os animais foram transportados de volta ao biotério onde uma pipeta contendo uma nova solução (nicotina ou sacarina) foi disponibilizada em cada gaiola.

Devido ao aumento significativo da massa corporal (massa) que ocorre durante a adolescência, os dados relativos ao consumo diário de fluido (ingestão) foram obtidos dividindo os valores absolutos da ingestão líquida de cada animal por sua própria massa corporal (ingestão/massa).

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

Sendo:

$$NICOTINA_{DIAi} = DOSE \times INGESTA_{DIAi} / MASSA_{DIAi}$$

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

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

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

$MASSA_{DIAi}$: massa do animal (em g) no dia i .

2.4 Testes comportamentais

Para investigar a ocorrência de diferenças marcantes na memória visuo-espacial em camundongos associadas à exposição individual à nicotina ou ao etanol, bem como à exposição concomitante a estas drogas durante a adolescência, utilizamos o teste comportamental do Labirinto Aquático de Morris, descrito abaixo. Adicionalmente, uma vez que o comportamento natatório poderia ser influenciado por alterações motoras e não por alterações no aprendizado/ memória destes animais, a função motora foi avaliada utilizando os testes do campo aberto e de locomoção forçada sobre cilindro giratório, descritos em seguida. Os testes comportamentais foram realizados dentro do horário estipulado para manipulação dos animais (entre 11h00min e 13h00min).

2.4.1 Labirinto Aquático de Morris

O Labirinto Aquático de Morris (LAM) é uma importante ferramenta em estudos que avaliam aprendizagem e memória em modelos experimentais (Morris et al., 1984) e vem sendo largamente usada na tentativa de se compreender os efeitos neurobiológicos da nicotina (Scerri et al., 2006; Socci et al., 1995) e do etanol (Cain et al., 2002; Markwiese et al., 1998) nos processos de formação de memória. Sendo o ambiente aquático aversivo a roedores (Filgueiras & Manhães, 2004), a premissa do teste é que, uma vez imersos, os animais procurarão sair da água o mais rápido possível.

O aparelho consistia em uma piscina circular (h=40 cm, r=116 cm), virtualmente dividida em quatro quadrantes, preenchida com água opaca de forma a tornar invisível uma plataforma de escape submersa 1 cm (h=28 cm, r=16 cm). A piscina estava localizada em uma sala com pistas visuais dispostas no ambiente de forma que o animal se orientasse espacialmente na busca pela plataforma, como mostra a Figura 3.

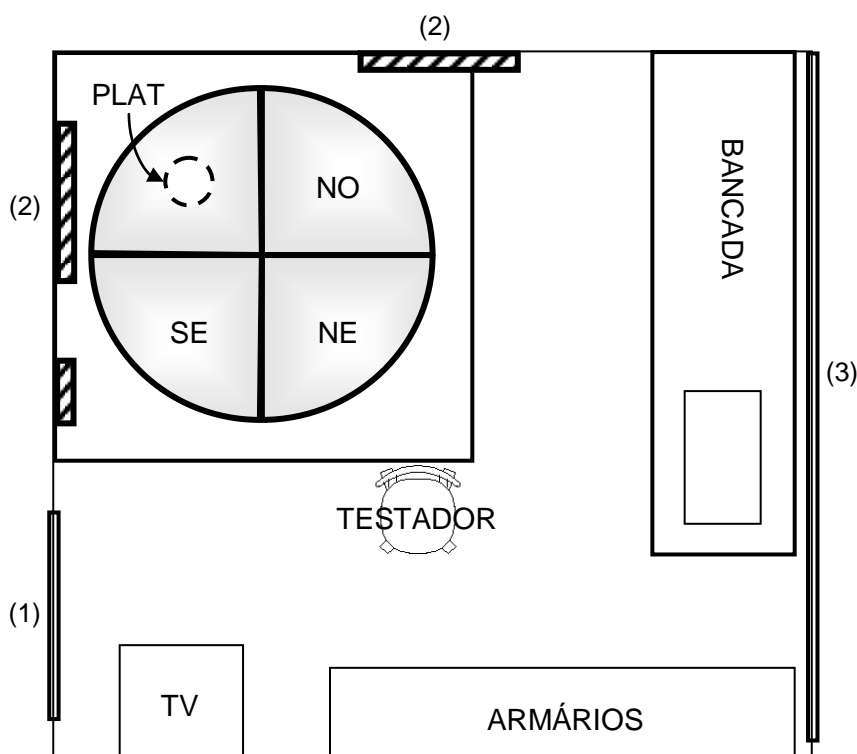


Figura 3. Ilustração esquemática da sala do teste Labirinto Aquático de Morris. (1) Porta de acesso à sala; (2) placas dispostas em torno da piscina como pistas visuais; (3) janelas cobertas por uma cortina de cor idêntica à parede; TV e armários posicionados no alto, também atuam como pistas espaciais; o testador era posicionado em uma cadeira de forma a ficar abaixo do campo visual dos animais em teste. PLAT = plataforma (que se encontra submersa e é representada por um círculo tracejado) posicionada no quadrante sudoeste; NO = quadrante noroeste; NE = quadrante nordeste; SE = quadrante sudeste.

Os testes ocorreram ao longo de sete dias consecutivos (PN38-44 ou PN50-56) e foram gravados por uma câmera posicionada 1 metro acima do centro da piscina para análise posterior.

Nos seis primeiros dias, foi realizada uma sessão de treinamento por dia de teste, cada sessão com três tentativas a intervalos de 30 minutos. Cada tentativa consistia em colocar o animal na água com o focinho voltado para a parede da piscina para que nadasse, dentro de um período de latência de 2 minutos, até que encontrasse a plataforma submersa e nela permanecesse por 10 segundos. Caso não a encontrasse, o animal era conduzido à plataforma. A plataforma permaneceu sempre em um mesmo quadrante ao longo das sessões de teste e os animais foram colocados em quadrantes alternados sucessivamente ao longo das tentativas. A latência para encontrar a plataforma foi utilizada como medida de aprendizado.

No último dia de teste, o animal foi provado em uma única tentativa, sem a plataforma na piscina, na qual nadou livremente ao longo de 2 minutos. O número de investidas no local da plataforma em comparação ao local correspondente nos três outros quadrantes foi considerado medida de aprendizado.

2.4.2 Teste de campo aberto

Através da avaliação da atividade locomotora, o teste de campo aberto fornece indicadores de alterações neurológicas devidas à exposição a substâncias neurotóxicas. A medida de atividade locomotora vem sendo utilizada em combinação com testes de memória (Carey et al., 1998), como um indicador comportamental de atividade exploratória (Crusio, 2001) e de ansiedade (Prut & Belzung, 2003).

O aparelho consistia em uma caixa retangular de polipropileno (37,6 x 30,4 x 17 cm), dividida em 16 retângulos (9,4 cm x 7,6 cm), quatro centrais e doze periféricos, como pode ser visto na Figura 4 abaixo.

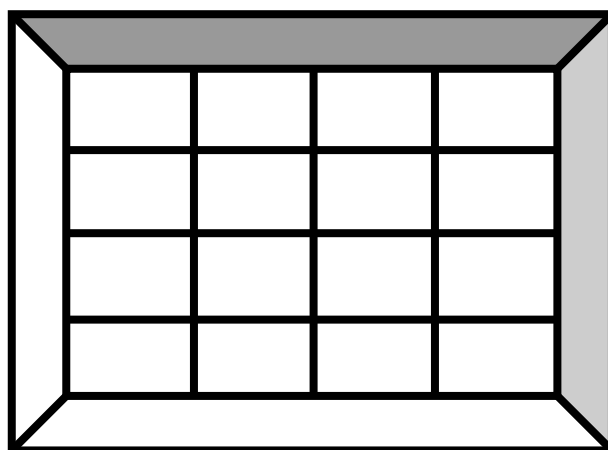


Figura 4. Imagem esquemática do dispositivo de teste de campo aberto com divisórias retangulares ao fundo, sendo 4 dispostas ao centro e 12 periféricas.

O teste foi realizado no dia consecutivo ao último dia de teste no Labirinto Aquático de Morris (PN45 ou PN57) em uma única sessão, com duração de 5 minutos, na qual os animais eram colocados no centro da caixa, sempre virados para o mesmo lado da caixa. Os testes foram gravados para posterior análise do comportamento do animal.

Como medida de atividade, utilizamos o número de retângulos em que o animal coloca as quatro patas. A ambulação nos retângulos do centro (C), nos retângulos da periferia (P) e a ambulação total (C+P) foram utilizadas como medidas de atividade. Uma vez que as comparações entre as atividades no centro e na periferia podiam ser influenciadas pelo maior número de retângulos na periferia da arena, também quantificamos o percentual de ambulação no centro em relação à ambulação total (%C) e a relação C/P.

2.4.3 Teste de locomoção forçada em cilindro giratório - ROTAROD

A locomoção forçada sobre cilindro giratório (ROTAROD) é um teste que avalia, especificamente, déficits de coordenação motora e equilíbrio em roedores (Dunham & Miya, 1957) largamente utilizado em modelos experimentais (Brooks & Dunnett, 2009; Lalonde & Strazielle, 2007).

Trinta minutos após o teste de campo aberto, os animais foram colocados individualmente sobre o cilindro ($r=3,2$ cm; $h=20$ cm) que gira, inicialmente, a uma velocidade de 4 RPM (Figura 5). Quando o animal se adaptava à plataforma, a velocidade de rotação era aumentada de 4 a 40 RPM num intervalo de 120 segundos. Foram registradas a latência para a queda (LAT) e a velocidade de rotação do cilindro no momento da queda (VEL) ao longo de 5 tentativas a intervalos de 10 segundos.



Figura 5. Fotografia do aparelho de teste de locomoção forçada em cilindro giratório.

A análise comportamental envolveu 2 idades, 4 tratamentos e 2 sexos. Os animais foram distribuídos da seguinte forma: PN38-45: NIC+ETOH fêmeas=11, machos=12; NIC fêmeas=12, machos=11; ETOH fêmeas=12; machos=9; VEH fêmeas=11, machos=11. PN50-57: NIC+ETOH fêmeas=11, machos=15; NIC fêmeas=11, machos=13; ETOH fêmeas=12; machos=14; VEH fêmeas=12, machos=12.

2.5 Análise Bioquímica

2.5.1 Medidas dos níveis séricos de cotinina e etanol

Para que o estudo fosse conduzido adequadamente, foi necessário produzir níveis séricos de cotinina (principal metabólito da nicotina) e etanol compatíveis com aqueles encontrados em adolescentes humanos.

Em um mesmo modelo de exposição à nicotina e ao etanol, com uma linhagem de camundongos isogênicos (*inbred*) (C57Bl/6), Ribeiro-Carvalho e colaboradores (2009) encontraram níveis séricos de cotinina e etanol comparáveis aos encontrados em adolescentes usuários destas drogas. Uma vez que no presente estudo utilizamos uma linhagem heterogênea (*outbred*) de camundongos, quantificamos estas substâncias no soro destes animais visando verificar se os níveis encontrados são similares aos encontrados em adolescentes humanos e, adicionalmente, pela comparação entre os grupos expostos à nicotina (NIC *vs.* NIC+ETOH) e ao etanol (ETOH *vs.* NIC+ETOH), verificamos possíveis interferências farmacocinéticas na interpretação de nossos resultados.

Para analisar as concentrações séricas de etanol e cotinina, dois grupos de animais foram tratados especificamente para esta etapa do experimento, não sendo submetidos aos testes comportamentais.

O primeiro grupo de animais foi destinado à análise dos níveis séricos de etanol. Os animais, tratados com nicotina e/ou etanol, foram sacrificados 30 minutos após a última injeção de etanol (PN44) – os camundongos foram decapitados e o sangue coletado dos seguintes grupos experimentais: VEH (n=5), ETOH (n=6) e NIC+ETOH (n=6). O sangue foi centrifugado a 3.000 RPM (MiniSpin, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 20 minutos e o sobrenadante, armazenado a 4°C até o procedimento bioquímico. O material foi avaliado através de um kit enzimático (Alcohol Reagent Set, Pointe Scientific Inc., Canton, MI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, por espectrofotometria (General Purpose UV/Vis Spectrophotometer, Beckman Coulter DU720, CA, EUA) a 340nm.

O outro grupo de animais, igualmente tratado com nicotina e/ou etanol, foi sacrificado no final do tratamento (PN45) 1 hora após o início da fase escura. Animais dos grupos VEH (n=4), NIC (n=6), ETOH (n=4) e NIC+ETOH (n=6) foram decapitados e o sangue foi coletado e centrifugado (MiniSpin, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 3.000 RPM por 20 minutos a 4°C, sendo o soro armazenado a -20°C. Foi utilizado o kit de Elisa imunoensaio

para cotinina sérica (OraSure Technologies, Inc., Bethlehem, PA, EUA), conforme especificações do fabricante, analisado no leitor de placas de Elisa (Oasys UVM340, Asys Hitech, Áustria) a 450 e 630nm.

2.5.2 Avaliação do perfil de captação de [3H] D-aspartato em hipocampo

Estudos anteriores têm demonstrado que o uso da nicotina, bem como do etanol interferem nos processos de formação de memória e que estes efeitos têm sido associados à atividade do sistema glutamatérgico (Ahmadi et al., 2007; Rezvani & Levin et al., 2003; Mameli et al., 2005; Sircar & Sircar, 2006). Contudo, embora a manutenção extracelular de aminoácidos excitatórios, particularmente, o glutamato, seja relevante para as funções cognitivas (González & Robinson, 2004), não há estudos que demonstrem a interação entre estas drogas e os mecanismos de transporte de aminoácidos excitatórios na adolescência.

Para avaliar as mudanças na atividade deste sistema devidas à exposição ao etanol e/ou à nicotina, os níveis de captação de aminoácidos excitatórios foram quantificados utilizando [3H] D-aspartato como um marcador do compartimento glutamatérgico. Estas ações podem ter associação direta ou indireta nas funções de aprendizado e memória.

Antes de analisarmos os efeitos de nicotina e/ou etanol no transporte de aminoácidos excitatórios, foi traçado o perfil de captação de [3H] D-aspartato de animais normais. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, decapitados e o hipocampo foi rapidamente dissecado, cortado em pedaços e incubado com 0,5 µCi [3H] D-aspartato (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) em diferentes condições experimentais como descrito a seguir:

- (1) Para identificar o mecanismo de dependência iônica no transporte de AAE e caracterizar se o transportador envolvido nesta atividade era de alta afinidade (transporte dependente de íons sódio) ou baixa afinidade (independente de sódio) o tecido hipocampal foi incubado em solução Hanks-4-Tris (Tris: 128mM; KCl: 4mM; MgCl₂: 1mM; CaCl₂: 3mM; pH=7,4); onde a osmolaridade, originalmente mantida pelo sódio, foi mantida pela substituição do sódio por 128mM de Tris-HCl (n=4 animais por condição iônica).
- (2) Para avaliar a influência do metabolismo celular no transporte de AAE, a captação de [3H] D-aspartato foi feita em Hanks-4 normal (NaCl: 128mM; KCl: 4mM; MgCl₂: 1mM; CaCl₂: 3mM; Hepes: 20mM; Glicose: 4mM; pH=7,4) a 4°C ou a 37°C (n=4 animais para cada temperatura analisada).

(3) Para avaliar a cinética temporal dos EAATs, o tecido foi incubado por 10, 30, 60, 90 e 120 minutos a 37°C em solução em Hanks-4 normal (n=4 animais para cada tempo de incubação).

(4) Para avaliar se existem diferenças na atividade de transporte de D-aspartato ao longo do desenvolvimento do hipocampo, foram utilizados tecidos de animais de diferentes idades (PN30, PN45, PN70, PN90) (n=4 animais por idade).

Ao final da incubação, a reação foi interrompida pela adição de Hanks-4 gelado e o tecido, lavado 3 vezes com a mesma solução de Hanks-4 gelado. Após a lise celular com adição de 1mL de água, o conteúdo de [3H] D-aspartato captado foi mensurado pelo método de cintilação líquida (Liquid Scintillation Analyzer, Tri-carb 2810 TR, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). Os valores foram expressos em pmol/mg/h. A normalização da quantidade de radioativo captado foi feita através da dosagem de proteína pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951).

2.5.3 Influência de NIC e/ou ETOH na captação de [3H] D-aspartato

Como descrito em detalhes na sessão de resultados foi escolhida o tempo de incubação de 60 minutos, momento em que o equilíbrio da captação foi atingido, para o estudo da influência da nicotina e/ou etanol da captação de aminoácidos excitatórios. Assim, para este estudo, o hipocampo dos camundongos foi submetido à análise bioquímica ao final do período de exposição (PN45) e em dois diferentes períodos de retirada (PN50 e PN57).

Frações do hipocampo foram preparadas e incubadas a 37°C com 0,5μCi de [3H] D-aspartato (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) por 60 minutos com solução salina acrescida de 4mM de glicose Hanks-4. Ao final da incubação, a reação foi interrompida pela adição de Hanks-4 gelado. O conteúdo de [3H] D-aspartato captado foi mensurado pelo método de cintilação líquida, após a lise celular com adição de 1mL de água. A normalização da quantidade de radioativo captado, em cada grupo experimental, foi feita através da dosagem de proteína pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). Os valores foram expressos em pmol/mg/h (PN45: fêmeas=14, machos=23; PN50: fêmeas=21, machos=21; PN57: fêmeas=22; machos=21).

2.5.4 Avaliação dos EAATs

Para determinar quais os subtipos de transportadores estariam diretamente implicados na manutenção dos níveis extracelulares de AAE no hipocampo, foi utilizado o mesmo procedimento e parâmetros para captação de [3H] D-aspartato, durante a incubação dos tecidos, onde utilizamos os seguintes bloqueadores: para o transportador neuronal EAAT3 e para o transportador glial EAAT1, 30 μ M e 100 μ M de DL-TBOA (TOCRIS bioscience, Ellisville, MI, USA) respectivamente, segundo especificações do fabricante; para o subtipo glial EAAT2, utilizamos 100 μ M de DHK (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os inibidores dihidrocainato (DHK) e cainato, além de agonistas de receptores KA, são bloqueadores específicos de EAAT2 (Arriza et al., 1994) e o composto DL-Threo- β -benzoxiaspartato (TBOA), primeiramente caracterizado como o inibidor não competitivo mais potente para o EAAT2 (Lebrum et al., 1997; Shimamoto et al., 1998), atua em todos os subtipos de EAATs (Shimamoto et al., 2000).

Baseado no estudo acima e justificado na sessão de resultado, foi avaliada a expressão do GLAST/EAAT1 no hipocampo através da técnica de *Western-blot*. Neste experimento, foram utilizadas duplicatas de 1 animal X 2 idades x 4 grupos experimentais (n=8).

Amostras do hipocampo de animais expostos à NIC e/ou ao ETOH foram homogeneizadas com tampão de homogeneização com um coquetel inibidor de proteases. A concentração de proteínas foi estimada utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram diluídas em tampão (10% glicerol (v/v); 1% β -mecarptotanol; 3% SDS; base Tris 62,5mM) e aquecidas a 100°C em banho-maria por 5 minutos.

Aproximadamente, 30 μ g de proteína de cada amostra sofreram eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (10% SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) e foram transferidas para membranas de nitrocelulose (ECL-Hybond, GE Healthcare, South San Francisco, CA, EUA). As condições de corrida eletroforética e de transferência para a membrana seguiram as indicações do fabricante (mini-PROTEAN Tetra System e Transblot SD Semi-dry Transfer Cell, BIORAD, Hercules, CA, EUA).

Para o anticorpo primário anti-EAAT1 (Santa Cruz Biotechnology, INC), foi utilizada a diluição (1:1000), as membranas foram lavadas com TTBS (*Tris-Tween Buffered Saline*) e bloqueadas por 2h com BSA (albumina sérica bovina) diluído em leite desnatado a 5%. As amostras foram incubadas com os anticorpos primários *overnight* a 4°C, lavadas com TTBS e incubadas com os anticorpos secundários anti-coelho (1:5000) conjugados *horseradish* peroxidase (HRP) por 2 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens de TTBS (10 minutos cada), a marcação foi feita com kit de ECL (quimioluminescência) (1:40, GE Healthcare, South San Francisco, CA, EUA).

As membranas foram reincubadas com anticorpo anti-tubulina (1:5000) em TTBS, (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 1h, lavadas com TTBS e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse (1:5000) conjugado a *horseradish* peroxidase (HRP) por 45 minutos. Após 3 lavagens com TTBS (15 minutos cada), a marcação foi detectada com kit ECL. Todos os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente.

Foram utilizadas as seguintes soluções para eletroforese, transferência e imunodeteção:

- (a) Tampão de homogeneização (Tris: 20mM; $MgCl_2$: 10mM; $CaCl_2$: 0,6mM; EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*): 0,5mM; DTT (*dithiothreitol*): 100mM; PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*): 100mM; aprotinina: 10mg/ml; leupeptina: 2mg/ml; triton-X100 10%; pH=7,4).
- (b) Tampão de amostra (SDS 2%; glicerol 10%; β -mercaptoetanol 5%; Tris 0,5M).
- (c) Tampão de corrida (glicina: 0,192M; Tris: 0,025M; SDS 0,1%; azul de bromofenol).
- (d) Tampão de transferência (Tris: 24,7mM; glicina: 0,198M; SDS 10%; metanol 20%).
- (e) Tampão de lavagem (TTBS) (Tris: 50mM; NaCl: 150mM; $MgCl_2$: 1mM; Tween20 0,1%).
- (f) Gel de corrida (Tris: 1,5M; pH=8,8; acrilamida 30%; bisacrilamida 0,9%; TEMED; persulfato de amônia (APS) 10%).
- (g) Gel de carregamento (Tris: 0,5M; pH=6,8; acrilamida 30%; bisacrilamida 0,9%; TEMED; APS 10%).

2.6 Análise estatística

Os dados comportamentais e bioquímicos foram compilados como médias e erros padrão da média. A significância foi assumida a valores de $P < 0,05$. Para interações $P < 0,10$ (bicaudal), também foi examinado se efeitos principais de menor ordem eram detectáveis após as subdivisões dos fatores interativos (Snedecor & Cochran, 1967).

2.6.1 Análise da relação ingesta de líquido / massa corporal, consumo de nicotina e massa corporal

Inicialmente, foram realizadas análises de variância de repetição (ANOVA_r) para as variáveis: massa corporal; consumo de líquido/massa corporal e consumo de nicotina.

TRATAMENTO (VEH, NIC, ETOH e NIC+ETOH) e SEXO foram usados como fatores. O DIA foi considerado o fator de repetição. Sempre que interações significativas entre TRATAMENTO e os demais fatores foram detectadas, ANOVAs apropriadas de menor ordem foram utilizadas, seguidas pelas análises comparativas *post-hoc* FPLSD (Fisher's Protected Least Significant Difference).

2.6.2 Labirinto Aquático de Morris

Para avaliar as sessões de treinamento, os resultados foram analisados inicialmente por uma ANOVA para cada um dos períodos de teste (PN38-45 e PN50-57), onde SESSÃO foi considerada como fator de repetição e TRATAMENTO e SEXO como fatores. A média dos três testes por dia de treinamento foi usada como valor de SESSÃO. Interações entre TRATAMENTO e SEXO e SESSÃO foram avaliadas por ANOVAs de menor ordem seguidas de análises comparativas *post-hoc* FPLSD (Fisher's Protected Least Significant Difference). Para a análise da sessão de prova, foram feitas ANOVAs univariadas para cada grupo experimental, onde QUADRANTE foi considerado como fator, seguidas pelas análises comparativas *post-hoc* FPLSD (Fisher's Protected Least Significant Difference).

2.6.3 Teste de campo aberto

Foram realizadas ANOVAs univariadas em cada idade analisada (PN45 e PN57) com os fatores TRATAMENTO e SEXO. As variáveis avaliadas foram: a ambulação nos retângulos do centro (C), nos retângulos da periferia (P), a ambulação total (C+P) e o percentual de ambulação no centro em relação à ambulação total (%C) e a relação C/P. Se efeitos significativos fossem encontrados, comparações entre grupos de tratamento eram realizadas pelas análises comparativas *post-hoc* FPLSD.

2.6.4 Teste de locomoção forçada sobre cilindro giratório - ROTAROD

Os resultados do Teste de locomoção em cilindro giratório foram avaliados inicialmente por uma rANOVA em cada idade analisada (PN45 e PN57) com TENTATIVA

como fator de repetição e TRATAMENTO e SEXO como fatores. TESTE foi considerado o fator de repetição. Interações entre TRATAMENTO e os demais fatores foram seguidas por ANOVAs de menor ordem. Se efeitos significativos fossem encontrados, comparações entre grupos de tratamento eram realizadas pelas análises comparativas *post-hoc* FPLSD.

2.6.5 Transporte de aminoácidos excitatórios

ANOVAs univariadas foram utilizadas para avaliar: (1) Mecanismos de dependência iônica, considerando CONDIÇÃO IÔNICA como fator; (2) Temperatura para a eficiência de transporte de D-aspartato, considerando TEMPERATURA como fator; (3) Tempo de incubação necessário para saturação do transporte de D-aspartato, considerado TEMPO como fator; (4) Perfil de captação ao longo do desenvolvimento do SNC considerando IDADE como fator.

Para avaliação do efeito da nicotina e/ou etanol na captação de [3H] D-aspartato e da imunodeteção de proteínas, foram realizadas ANOVAs univariadas para cada idade (PN45, 50 e 57) sendo considerados TRATAMENTO e SEXO como fatores seguidas pelas análises comparativas *post-hoc* FPLSD.

Para avaliar o bloqueio de transportadores, foi realizada uma ANOVA univariada sendo considerado BLOQUEADOR como fator, seguida pelas análises comparativas *post-hoc* FPLSD.

2.7 **Análise das interações entre nicotina e etanol**

O desenho estatístico unidimensional descrito abaixo, em que TRATAMENTO (VEH, NIC, ETOH e NIC + ETOH) foi considerado como fator, foi usado para verificar se existiam diferenças significativas entre os quatro grupos de tratamento. Entretanto, o uso combinado de nicotina e etanol pode ter um efeito mais que aditivo (sinergista), menos que aditivo ou aditivo que não são detectados pelo desenho unidimensional. Desta forma, foi usada uma análise bidimensional (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008; Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009; Rhodes et al., 2003). Neste desenho, NICOTINA (tratados: NIC e NIC+ETOH; não-tratados: VEH e ETOH) e ETANOL (tratados: ETOH e NIC+ETOH; não-tratados: VEH e NIC) foram considerados fatores. Nesta formulação, efeitos mais que aditivos (sinergistas) e menos que

aditivo aparecem como interações significativas entre as duas dimensões, enquanto efeitos aditivos não mostram interações significativas.

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos na massa corporal, ingesta/massa e consumo de nicotina

Nossos resultados indicam que o ganho de massa dos animais foi diferenciado entre machos e fêmeas (SEXO: $F_{(1, 194)}=26,4$; $P<0,0001$) e foi afetado pela exposição às drogas (TRATAMENTO: $F_{(3,194)}=2,9$; $P=0,03$), contudo, este efeito não foi homogêneo ao longo dos dias de tratamento (TRATAMENTO×DIA: $F_{(42,2716)}=1,7$; $P=0,003$) e não apresentou uma interação significativa entre o tratamento e o sexo. Basicamente, o grupo tratado com NIC+ETOH ganhou menos massa que os grupos VEH e NIC a partir do 7º dia de exposição mantendo-se a diferença entre os grupos até o final do tratamento. Quando consideramos NICOTINA e ETANOL como fatores em separado na análise, a ANOVA não mostrou interação entre eles, o que indica que a redução do ganho de massa do grupo NIC+ETOH refletiu a soma dos efeitos da NIC e do ETOH (NIC×ETOH: $F_{(1, 194)}=1,85$; $P=0,43$; DIA×NIC×ETOH: $F_{(14, 2716)}=0,9$; $P=0,85$).

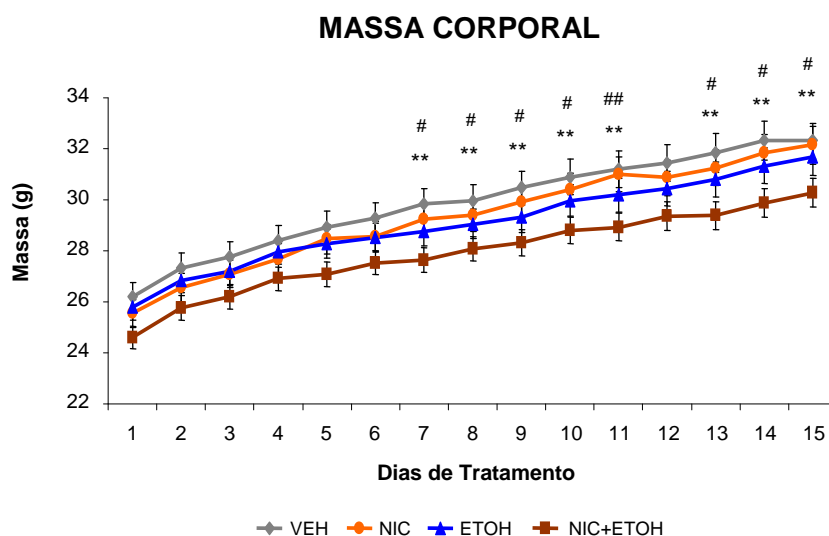


Figura 6. O grupo NIC+ETOH apresentou redução significativa do ganho de massa em relação aos grupos VEH e NIC a partir do 7º dia de tratamento. Não houve efeito significativo do sexo. Valores apresentados nos gráficos correspondem à Média ± Erro Padrão da Média. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P<0,05$. VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e etanol concomitantemente. *NIC+ETOH≠VEH; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$. #NIC+ETOH≠NIC; # $P<0,05$; ## $P<0,01$; ### $P<0,001$.

Como indicado pela ANOVA, a relação ingesta líquida/massa corporal também foi diferenciada entre machos e fêmeas, com uma maior ingesta/massa por parte dos machos (SEXO: $F_{(1,194)}=7,4$; $P=0,007$), no entanto, não houve interação significativa do fator sexo com os demais. A relação ingesta/massa diminuiu ao longo do experimento (DIA: $F_{(14,2716)}=31,7$; $P<0,0001$) tendo sido diferentemente afetada pelo tratamento com as drogas (TRATAMENTO: $F_{(3,194)}=13,1$; $P<0,0001$; DIA \times TRATAMENTO: $F_{(42,2716)}=2,1$; $P<0,0001$). Ao longo do período de exposição às drogas, a ingesta/massa foi reduzida no grupo NIC+ETOH (NIC+ETOH<VEH) e para o grupo NIC (NIC<VEH). Considerando separadamente NICOTINA e ETANOL como fatores em nossa análise, a ANOVA não mostrou interação entre eles, o que indica que a redução da ingesta/massa refletiu a soma dos efeitos da NIC e do ETOH (NIC \times ETOH: $F_{(1,194)}=1,6$; $P=0,21$; DIA \times NIC \times ETOH: $F_{(14,2716)}=0,9$; $P=0,50$). Não houve interação entre TRATAMENTO e SEXO.

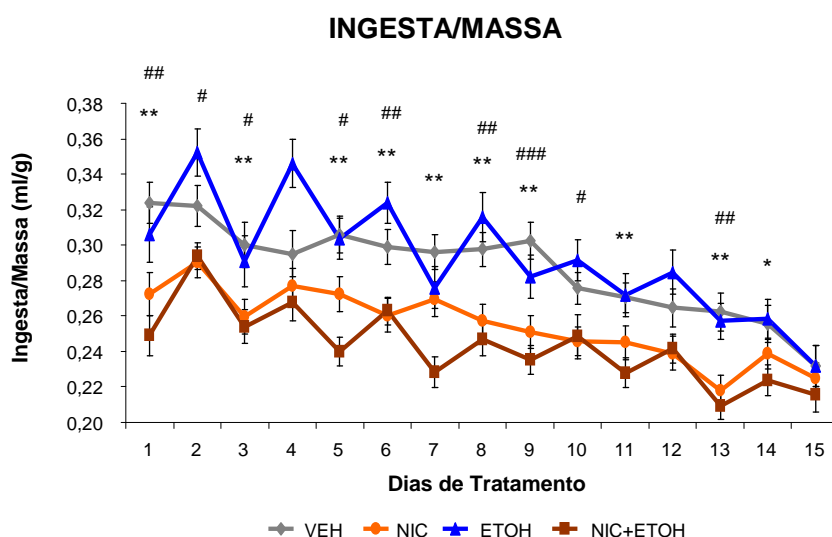


Figura 7. A relação ingesta/massa diferiu entre os grupos experimentais ao longo dos dias de tratamento. Os valores apresentados nos gráficos correspondem à Média \pm Erro Padrão da Média. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P<0,05$. VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e etanol concomitantemente. *NIC+ETOH \neq VEH; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$. #NIC \neq VEH; # $P<0,05$; ## $P<0,01$; ### $P<0,001$.

O consumo de nicotina foi reduzido ao longo dos dias de exposição às drogas (DIA: $F_{(14,1400)}=14,5$; $P<0,0001$). Embora o consumo tenha sido afetado pelo tratamento (TRATAMENTO \times DIA: $F_{(14,1400)}=1,5$; $P=0,08$), isto refletiu resultados inconsistentes uma vez que uma redução no consumo para o grupo NIC+ETOH quando comparado ao grupo NIC foi restrita ao quinto ($F_{(1,100)}=6,4$; $P=0,01$) e ao sétimo dias ($F_{(1,100)}=9,5$; $P=0,003$) (Figura 8).

Os dados de massa, ingesta/massa e consumo de nicotina indicam um efeito principal da NICOTINA nestes resultados.

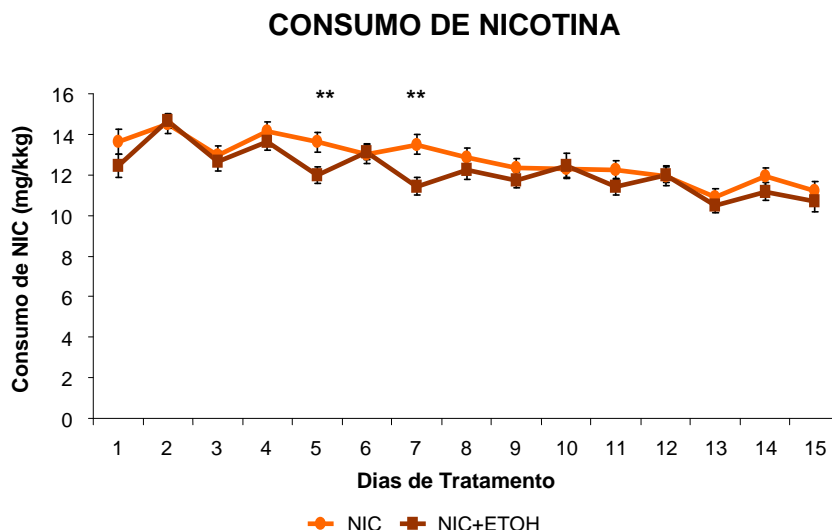


Figura 8. O consumo de nicotina diminuiu significativamente ao longo do experimento, contudo, não foi consistentemente afetado pelo tratamento. Houve uma redução do consumo do grupo NIC+ETOH no 5º e 7º dias em relação ao grupo NIC. Valores representados nos gráficos correspondem à Média \pm Erro Padrão da Média. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. NIC = grupo exposto à nicotina; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e etanol concomitantemente. $**P < 0,01$.

3.2 Medidas séricas de cotinina e etanol

Os níveis de cotinina sérica não diferiram entre os grupos de animais expostos à NIC ($74,87 \pm 51,72$ ng/ml) e NIC+ETOH ($74,98 \pm 43,42$ ng/ml). Para os grupos VEH e ETOH, os camundongos apresentaram níveis de cotinina abaixo dos limites de detecção da técnica (< 8 ng/ml).

Os níveis de concentração sérica de etanol 30 minutos após a última injeção da droga (PN44) não diferiram entre os grupos ETOH e NIC+ETOH (ETOH: $223,77 \pm 9,32$ mg/dl; NIC+ETOH: $216,12 \pm 31,59$ mg/dl; VEH: $0,60 \pm 5,03$ mg/dl).

3.3 Labirinto Aquático de Morris

Em PN38-45, houve uma queda da latência para encontrar a plataforma ao longo dos dias de treinamento como indicado pela ANOVA (efeito de SESSÃO: $F_{(5,325)}=56,6$; $P<0,0001$), tendo, as fêmeas, uma latência maior que a dos machos para a execução da tarefa (efeito de SEXO: $F_{(1,65)}=20,7$; $P<0,0001$). O desempenho no Labirinto Aquático de Morris foi afetado pela exposição às drogas (TRATAMENTO: $F_{(3,65)}=4,0$; $P=0,011$): houve um aumento da latência para encontrar a plataforma ao longo das sessões de teste nos grupos ETOH ($P=0,047$; FPLSD) e NIC+ETOH ($P=0,002$; FPLSD) em relação ao VEH, bem como no grupo NIC+ETOH em relação ao NIC ($P=0,036$; FPLSD). Considerando separadamente NICOTINA e ETANOL como fatores em nossa análise, a ANOVA não mostrou interação entre eles, o que indica que o desempenho no labirinto aquático refletiu a soma dos efeitos da NIC e do ETOH (NIC×ETOH: $F_{(1,72)}=0,001$; $P=0,97$; SESSÃO×NIC×ETOH: $F_{(14,2716)}=0,9$; $P=0,50$). Na sessão de prova, apenas os animais dos grupos VEH (efeito do QUADRANTE: $F_{(3,60)}=6,6$; $P=0,001$; FPLSD: NO: $P=0,045$; NE: $P=0,003$; SE: $P=0,006$) e NIC (efeito do QUADRANTE: $F_{(2,46)}=5,7$; $P=0,005$; FPLSD: NO: $P=0,015$; NE: $P=0,002$; SE: $P=0,027$) foram capazes de distinguir a localização da plataforma em relação ao posicionamento homólogo nos três outros quadrantes, denotando, assim, a consolidação do mapa visuoespacial, enquanto os grupos ETOH (efeito do QUADRANTE: $F_{(2,39)}=5,6$; $P=0,007$; FPLSD: NO: $P=0,109$; NE: $P=0,014$; SE: $P=0,004$) e NIC+ETOH (efeito do QUADRANTE: $F_{(3,63)}=8,1$; $P<0,0001$; FPLSD: NO: $P=0,300$; NE: $P<0,0001$; SE: $P=0,003$) não distinguiram com precisão a localização a plataforma na sessão de PROVA. Estes resultados sugerem que a administração do etanol ao longo da adolescência isoladamente e concomitante à nicotina, leva a prejuízos da formação da memória visuoespacial, tendo o grupo NIC+ETOH a pior performance.

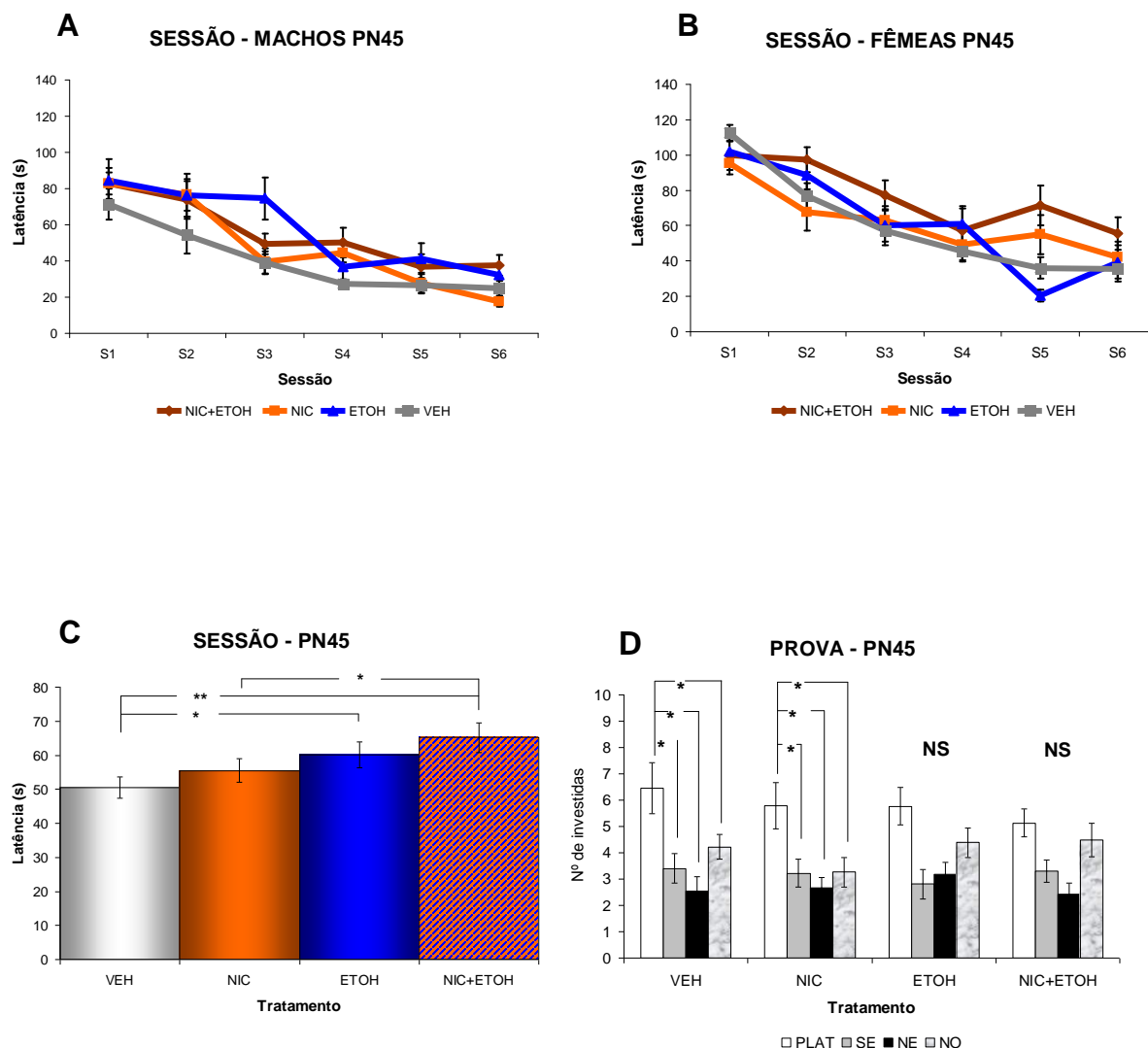


Figura 9. Desempenho dos animais ao longo das sessões de treinamento, sendo (A) machos e (B) fêmeas. (C) A figura mostra que a exposição ao ETOH leva a déficits de aprendizado, com efeitos mais proeminentes resultantes da co-administração, durante o período de aquisição. (D) Os déficits nos grupos ETOH e NIC+ETOH são corroborados pela formação incompleta do mapa visuoespacial na sessão de prova. Os valores apresentados nos gráficos correspondem à Média \pm Erro Padrão da Média. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. LAM = Labirinto Aquático de Morris; VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e etanol concomitantemente; PLAT = plataforma; NO = noroeste; NE = nordeste; SE = sudeste; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; NS = não significativo.

Em PN50-57, todos os grupos apresentaram uma queda da latência para localização da plataforma ao longo do treinamento (efeito de SESSÃO: $F_{(5,380)}=77,1$; $P < 0,0001$), no entanto, não houve uma interação com o tratamento, bem como um efeito isolado do tratamento ou efeito de sexo. Na sessão de PROVA, apenas os grupos VEH (efeito do QUADRANTE: $F_{(2,40)}=9,9$; $P < 0,0001$; FPLSD: NO: $P = 0,008$; NE: $P < 0,0001$; SE: $P = 0,022$) e ETOH (efeito do QUADRANTE: $F_{(3,72)}=17,4$; $P < 0,0001$; FPLSD: NO: $P = 0,002$; NE: $P < 0,0001$; SE:

$P < 0,0001$) foram capazes de diferenciar o local da plataforma do local análogo nos três outros quadrantes, enquanto os grupos NIC (efeito do QUADRANTE: $F_{(3,66)} = 5,5$; $P = 0,002$; FPLSD: NO: $P = 0,485$; NE: $P = 0,008$; SE: $P = 0,005$) e NIC+ETOH (efeito do QUADRANTE: $F_{(2,55)} = 8,8$; $P < 0,0001$; FPLSD: NO: $P = 0,118$; NE: $P = 0,001$; SE: $P < 0,0001$) não foram capazes de formar um mapa visuoespacial. Desta forma, os resultados sugerem que a retirada da nicotina parece afetar a consolidação deste tipo de tarefa de memória, uma vez que tanto o grupo NIC quanto NIC+ETOH apresentaram um pior desempenho na PROVA.

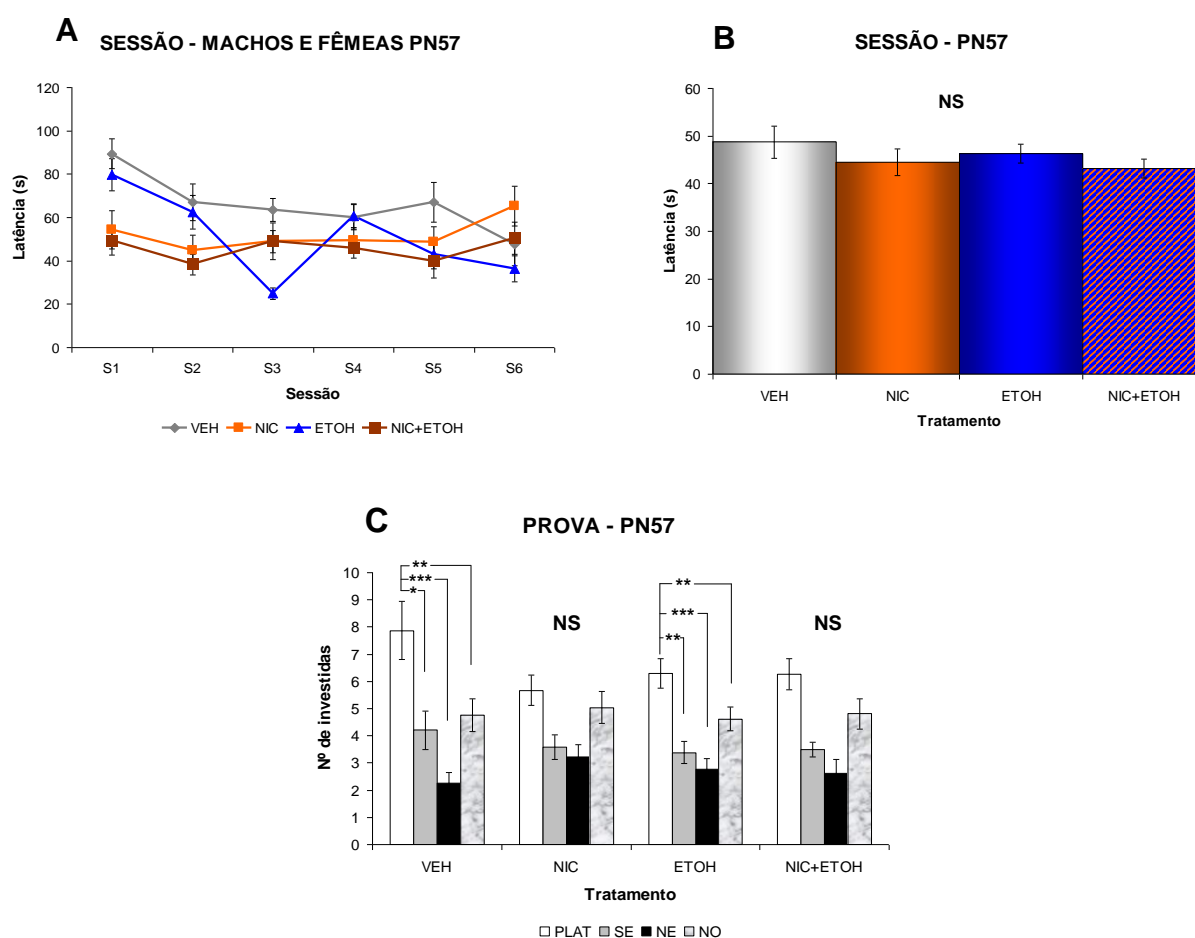
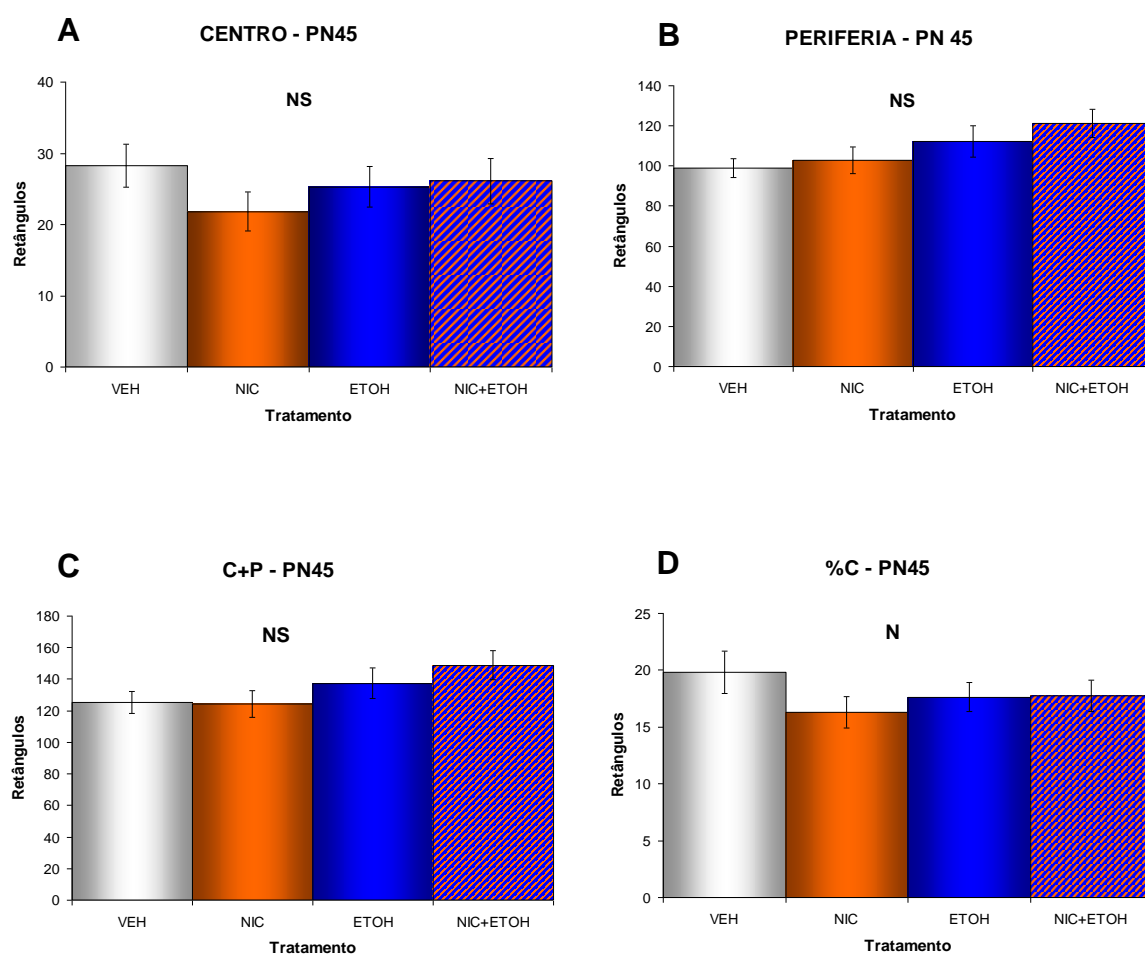


Figura 10. (A) Curvas de aprendizado ao longo das sessões de treinamento. (B) Apesar de durante o período de abstinência das drogas não ter havido diferenças no desempenho dos grupos ao longo das sessões de treinamento, (C) a retirada da nicotina dificultou a formação do mapa visuoespacial, como evidenciado na sessão de prova dos grupos NIC e NIC+ETOH. Os valores apresentados nos gráficos correspondem à Média \pm Erro Padrão da Média. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. LAM = Labirinto Aquático de Morris; VEH = grupo veículo; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e etanol concomitantemente; PLAT = plataforma; NO = noroeste; NE = nordeste; SE = sudeste; NS = não significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.4 Teste de campo aberto

Não houve diferença significativa na atividade locomotora entre os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados tanto para os grupos testados ao final do período de exposição quanto para os testados na retirada das drogas. Estes resultados sugerem que o uso de nicotina e/ou etanol nas doses administradas não afetam a atividade locomotora dos animais tanto na vigência das drogas durante a adolescência quanto após o tratamento.



(Continua)

(Conclusão)

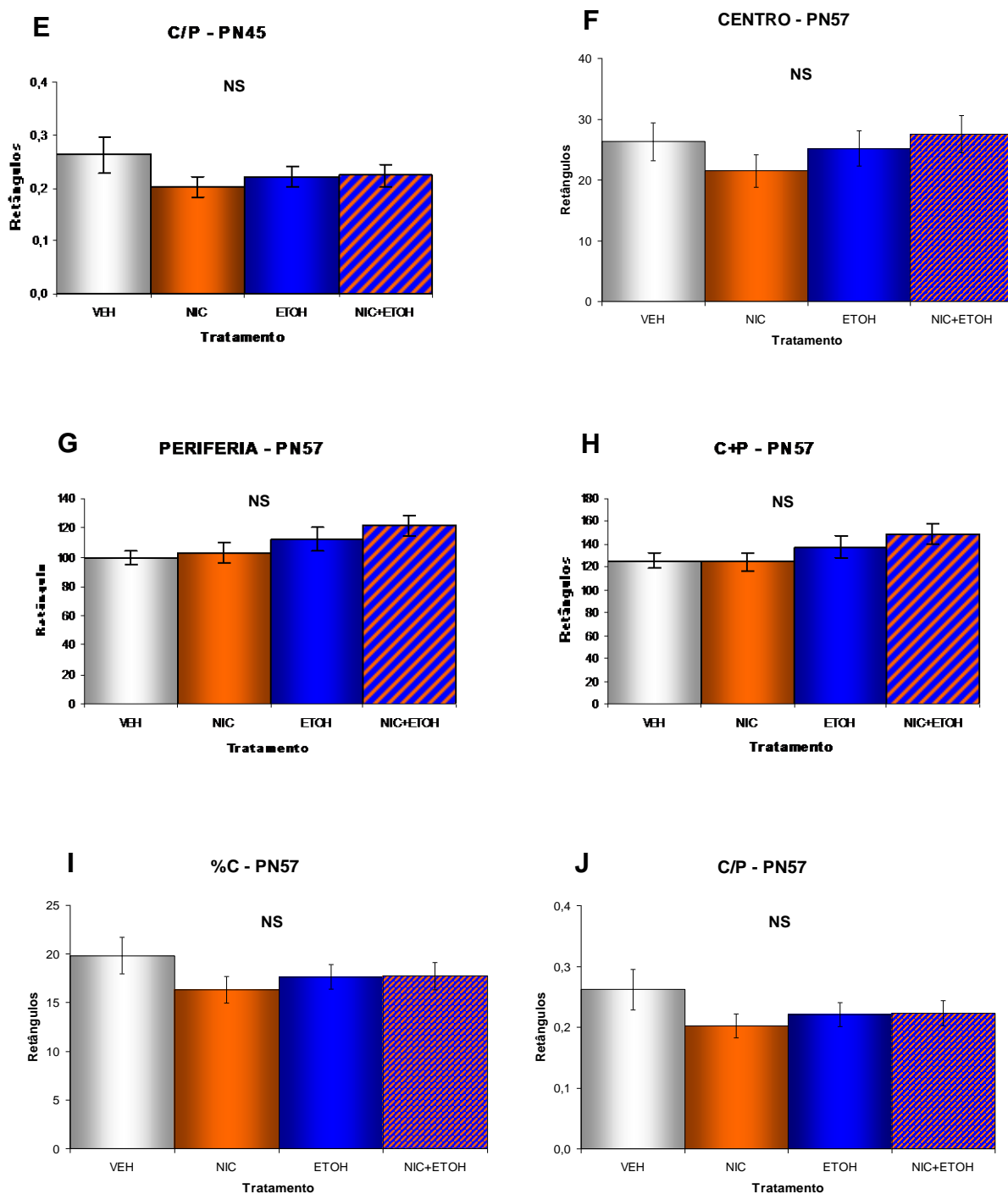


Figura 11. Não houve diferença entre os grupos de tratamento no Teste de Campo Aberto para todos os parâmetros analisados nas idades PN45 (figuras 11A a 11E) e PN57 (figuras 11F a 11J). Valores representam Média \pm Erro Padrão das medidas de ambulação. C = Centro; P = Periferia; VEH = grupo controle; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol. NS = não significativo.

3.5 Teste de locomoção forçada em cilindro giratório – ROTAROD

As Figuras 12A e 12B abaixo mostram um aumento da latência para queda da plataforma de teste ao longo das tentativas, o que representa uma melhora no desempenho dos animais no cilindro giratório – ROTAROD. Contudo, não houve diferença entre os grupos de tratamento de ambas as idades (efeito da TENTATIVA: PN45: $F_{(3,252)}=19,8$; $P<0,0001$; PN57: $F_{(3,292)}=31,6$; $P<0,0001$). Este resultado sugere que as doses de nicotina e/ou etanol administradas não afetam a coordenação e o equilíbrio dos animais durante e após a exposição durante a adolescência.

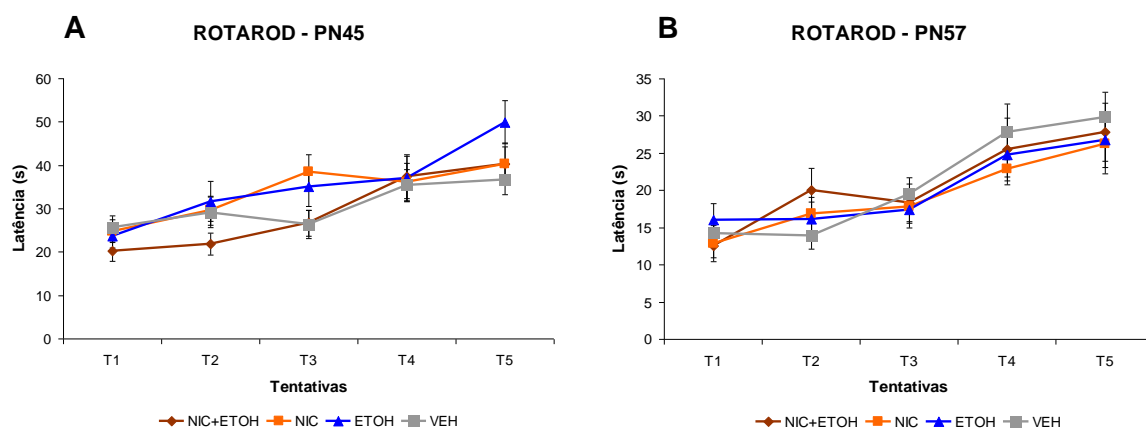


Figura 12. Todos os grupos experimentais apresentaram melhora significativa no Teste de Locomoção Forçada em Cilindro Giratório (ROTAROD) ao longo das tentativas ($P<0,0001$), porém, não houve efeito do tratamento em PN45 (Figura 12A) ou PN57 (Figura 12B). Valores representam Média \pm Erro Padrão da latência para queda do cilindro giratório; VEH = grupo controle; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol.

3.6 Análise bioquímica do sistema glutamatérgico

3.6.1 Condições de temperatura, dependência iônica e cinética temporal; captação de [3H] D-aspartato ao longo do desenvolvimento

As condições de temperatura e dependência iônica interferiram na captação de D-aspartato ($F_{(2,12)}=36,2$; $P<0,001$), que diminuiu significativamente a baixas temperaturas ($P<0,001$), assim como na ausência de sódio ($P<0,001$) (Figura 13A). A captação de D-aspartato aumentou com o tempo de incubação (TEMPO: $F_{(4,18)}=35,0$; $P<0,001$), chegando ao

equilíbrio com 60 minutos de incubação. Não houve alteração na captação de D-aspartato no hipocampo ao longo do desenvolvimento.

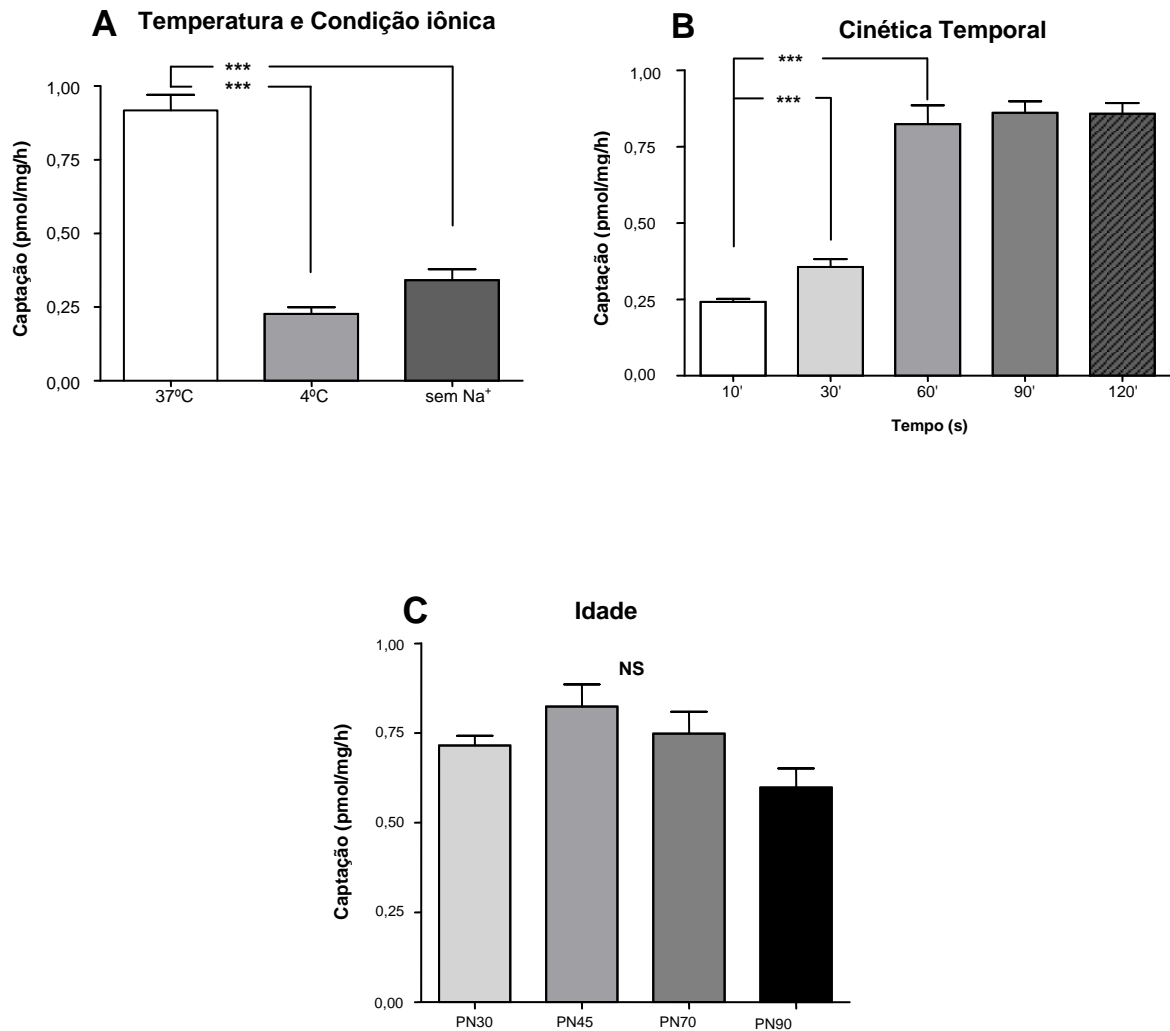


Figura 13. (A) A figura indica as condições de temperatura e condição iônica para captação de D-aspartato. (B) Demonstra o equilíbrio na captação dos transportadores de AAE, que ocorre aos 60 minutos de incubação. Valores representam Média \pm Erro Padrão da Média. (C) O gráfico acima indica não haver diferenças significativas na captação de AAE no hipocampo ao longo do desenvolvimento do animal. Valores representam Média \pm Erro Padrão da Média. NS = não significativo; *** $P < 0,001$.

3.6.2 Efeitos na atividade dos transportadores de aminoácidos excitatórios

A captação de D-aspartato foi afetada pela exposição às drogas ao final da adolescência (TRATAMENTO: $F_{(3,21)}=4,7$; $P=0,01$): em PN45, os grupos NIC ($P=0,001$), ETOH ($P=0,04$) e NIC+ETOH ($P=0,02$) apresentaram uma redução dos níveis de captação quando comparados ao VEH, com um efeito menos que aditivo da NICOTINA e do ETANOL (NICOTINA \times ETANOL: $F_{(1,22)}=4,0$; $P=0,05$). Tanto em PN50, cinco dias após o término da exposição à nicotina e/ou ao etanol, como em PN57, quando os animais já se encontravam na idade adulta jovem, a captação de D-aspartato nos grupos tratados não diferiu do controle, como mostrado nas Figuras 14 A, B e C.

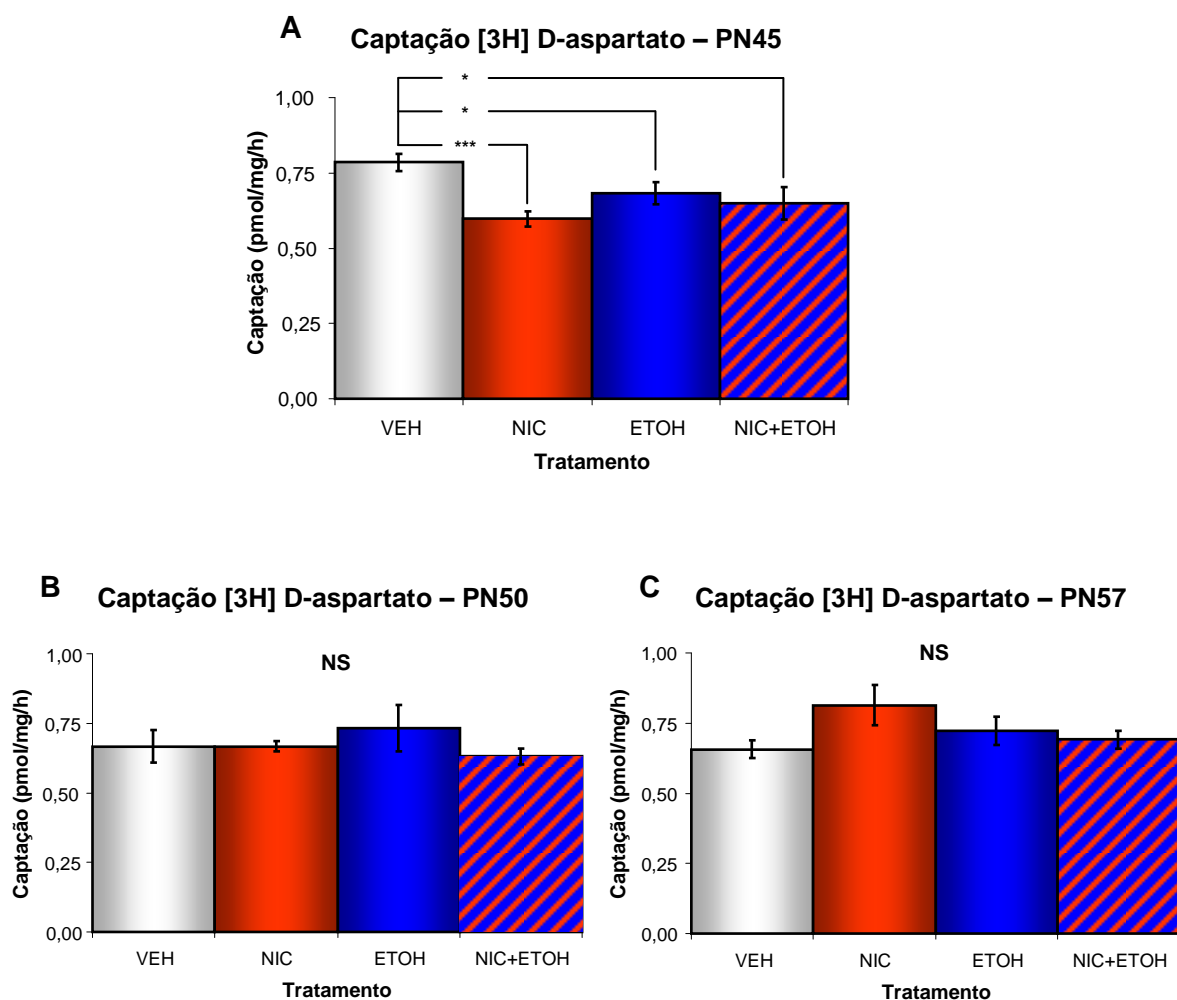


Figura 14. Os grupos expostos à nicotina, ao etanol, bem como o grupo que sofreu a dupla exposição apresentaram uma diminuição significativa na captação de D-aspartato ao final do período de exposição às drogas ($P < 0,001$). Valores representam Média \pm Erro Padrão. VEH = grupo controle; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol. NS = não significativo; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

3.6.3 Bloqueio de transportadores de aminoácido excitatório

Os resultados sugerem que o transportador de aminoácido excitatório glial GLAST/EAAT1 seja responsável por 50% da captação de AAE no hipocampo de camundongos Suíços em comparação ao transportador neuronal EAAC-1/EAAT3 e ao outro subtipo glial GLT-1/EAAT2, mais significativamente presente no prosencéfalo (efeito do BLOQUEADOR: $F_{(3,23)}=3,4$; $P<0,05$; FPLSD: VEH: $P<0,001$; EAAT3: $P<0,05$; EAAT2: $P<0,05$).

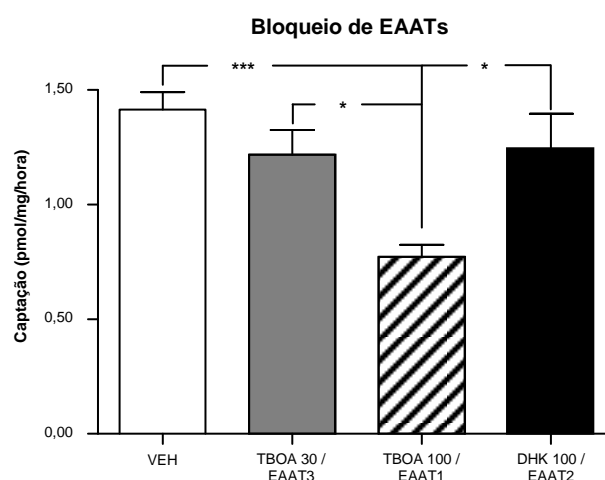


Figura 15. Os grupos expostos à nicotina, ao etanol, bem como o grupo que sofreu a dupla exposição apresentaram diminuição significativa na captação de D-aspartato ao final do período de exposição às drogas em função da presença de bloqueadores seletivos para EAAT1, EAAT2 e EAAT3 ($P<0,001$). Valores representam Média \pm Erro Padrão. * $P<0,05$; *** $P<0,001$.

3.6.4 Efeitos na expressão do transportador glial GLAST/EAAT1

Nossos resultados mostram que a exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência leva a uma redução de cerca de 40% na expressão do transportador GLAST/EAAT1 no hipocampo para os grupos NIC e ETOH e em torno de 20% para o grupo NIC+ETOH. Na abstinência, foi observada uma recuperação parcial destes efeitos, sendo maior para os grupos que receberam as drogas isoladamente: a redução na expressão do transportador glial foi de, aproximadamente, 20% para os grupos NIC e ETOH e 15% para NIC+ETOH. Entretanto, estes dados são bastante preliminares sendo necessário aumentar o número de experimentos para confirmar esta tendência.

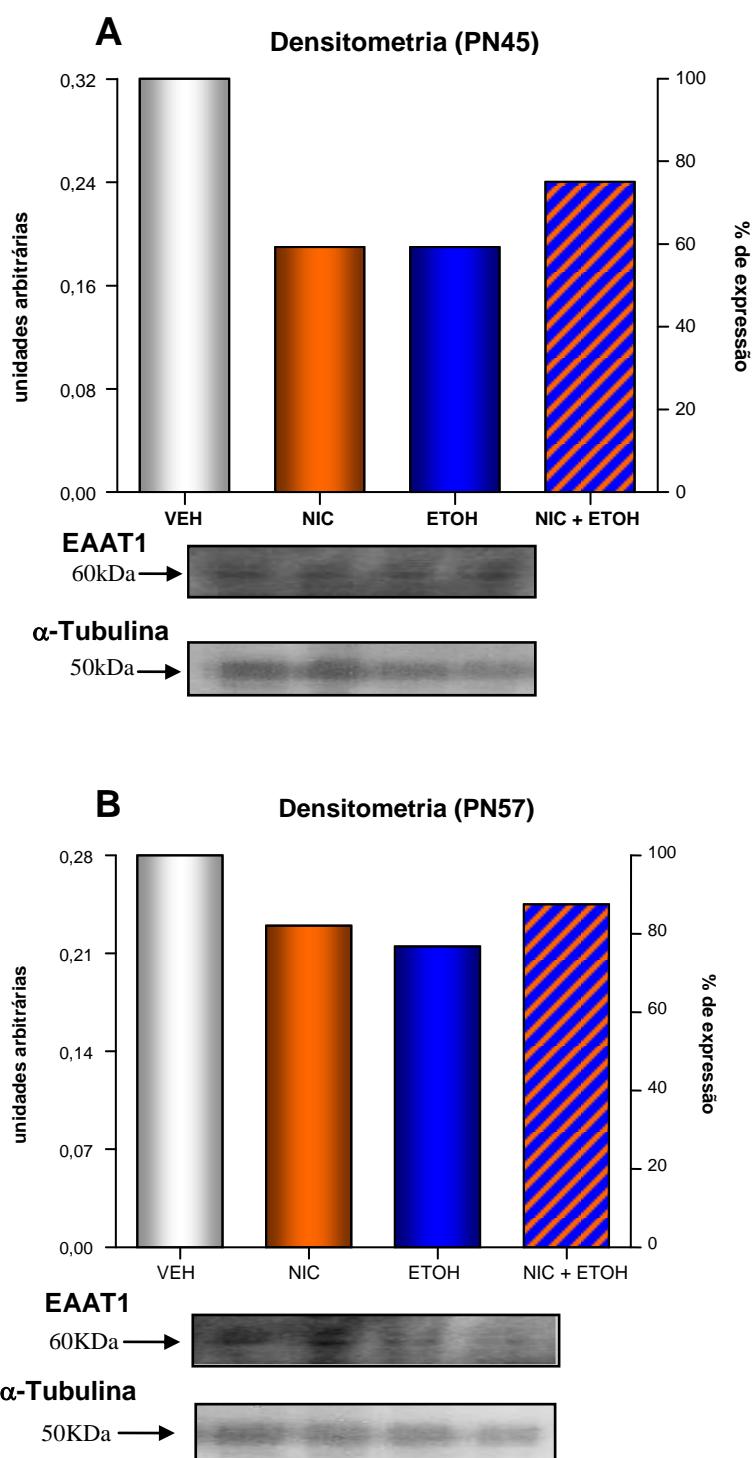


Figura 16. (A) (B) Os grupos expostos à nicotina, ao etanol, bem como o grupo que sofreu a dupla exposição apresentaram uma redução na expressão ao final do período de exposição às drogas. VEH = grupo controle; NIC = grupo exposto à nicotina; ETOH = grupo exposto ao etanol; NIC+ETOH = grupo exposto à nicotina e ao etanol.

4 DISCUSSÃO

O tabagismo e o consumo de bebidas alcóolicas estão frequentemente associados (Chen & Kandel, 1995; Schorling et al., 1994; Torabi et al., 1993). Além disso, estudos mostram que o início do hábito de fumar e beber ocorre frequentemente durante a adolescência, período do desenvolvimento no qual ocorrem neuroadaptações e alterações comportamentais (Lopez et al., 2001). Apesar dos dados epidemiológicos, há poucos estudos sobre as bases neurobiológicas que regem esta associação, principalmente no período crítico no uso de drogas que é a adolescência. Adicionalmente a achados recentes de que a nicotina e o etanol interagem durante a adolescência provocando alterações comportamentais (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008), neuroquímicas (Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009) e estruturais (Oliveira-da-Silva et al., 2009, 2010), nossos resultados fornecem evidências de que os efeitos na memória visuoespacial podem estar associados a alterações no sistema de transporte de aminoácidos excitatórios, como um denominador comum na interação da nicotina e do etanol na adolescência, demonstrando mecanismos de associação tanto durante a exposição das drogas como também no período de abstinência.

4.1 Considerações metodológicas

Considerando que algumas linhagens de ratos e camundongos demonstram aversão ao sabor da nicotina, em estudos anteriores de nosso laboratório, a linhagem de camundongos C57BL/6 foi utilizada pelo fato de animais adultos e periadolescentes desta cepa consumirem nicotina na concentração utilizada (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008; Manhães et al., 2008; Oliveira-da-Silva et al., 2009, 2010; Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009), além de ser uma das cepas mais usadas para estudos de efeitos comportamentais relacionados à nicotina (Siu & Tyndale, 2007). Adicionalmente, esta linhagem de camundongos endogâmicos apresenta outra particularidade, que é o alto consumo voluntário de etanol (Crawley et al., 1997). Apesar de as bases biológicas destas características não serem de todo conhecidas (Crabbe et al., 1999), tais fatores devem ser levados em consideração em estudos envolvendo a administração destas substâncias, visto que o mesmo pode não ocorrer em cepas heterogâmicas, como em Suíço.

Embora a exposição via oral à nicotina já tenha demonstrado gerar respostas comportamentais (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008; Adriani et al., 2002, 2004; Gaddnas et al.,

2001; Manhães et al., 2008), alterações neuroquímicas colinérgicas (Ribeiro-Carvalho et al., 2008; Sparks & Pauly, 1999) e monoaminérgicas (Gaddnas et al., 2000; Tammimaki et al., 2006; Vihavainen et al., 2006), bem como alterações na expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica induzidas por drogas de abuso (Marttila et al., 2006) em camundongos C57Bl/6 e em outras linhagens, não foram encontrados estudos utilizando um modelo de exposição semelhante com camundongos Suíços, de forma que os mecanismos determinantes do padrão de consumo e metabolização da nicotina nesta cepa ainda não são bem conhecidos. Por outro lado, inúmeros estudos empregam, com sucesso, esta linhagem de camundongos na avaliação dos efeitos da exposição ao etanol (Didone et al., 2009; Quoilin et al., 2011). Apesar destas peculiaridades, foram observadas diferenças significativas entre os grupos deste estudo. Estes resultados indicam que existem aspectos fundamentais da neurobiologia destes animais que são afetados pelo tratamento, os quais devem ser mais bem avaliados em futuras investigações. Assim, futuros estudos sobre as bases neurobiológicas da interação nicotina-etanol são necessários, bem como o uso de outras cepas e espécies pode fornecer dados valiosos.

4.2 Efeitos na massa corporal, ingesta/massa e consumo de nicotina

Como esperado, um efeito do sexo sobre o ganho de massa dos animais tratados foi observado, devido ao fato de machos pesarem mais que fêmeas. Além disso, apesar da massa corporal dos animais ter aumentado ao longo do período de exposição, identificamos uma proeminente diferença entre os grupos experimentais a partir do 7º dia até o final do tratamento. Assim, o ganho de massa ocorreu de forma dependente do tratamento, mas não houve interação entre tratamento e sexo. Particularmente, o grupo que sofreu a dupla exposição ganhou menos massa que o grupo veículo.

É sabido que nicotina e etanol, através de diferentes mecanismos, levam a uma menor aquisição de massa corporal. A ação do tabagismo sobre a massa corporal parece ser mediada pela nicotina (Hajek et al., 1988). Estudos prévios em humanos e animais têm demonstrado que a administração de nicotina leva a uma menor ingestão calórica com consequente diminuição da massa corporal (Wager-srdar et al., 1984; Grunberg, 1986; Hajek et al., 1988; Bellinger et al., 2003; Bishop et al., 2004; Klein et al., 2004). O mesmo se dá em animais Suíços adolescentes expostos à fumaça de cigarro (Abreu-Villaça et al., 2010). Estes efeitos anorexigênicos parecem ser mediados por sítios de ligação da nicotina presentes em regiões

do hipotálamo reguladoras do apetite (Jo et al., 2002), bem como pela elevação aguda na concentração de alguns neurotransmissores no cérebro, como a dopamina e serotonina (Klein et al., 2004). Por sua vez, o etanol é uma fonte eficaz de calorias, causando saciedade e consequente má alimentação quando consumido (Feldman, 1961). Além de seu valor calórico, o etanol altera o metabolismo intermediário dos carboidratos e lipídios (Lieber, 1966), bem como das vitaminas, por modificação da sua absorção e armazenamento, aumentando sua excreção (Burgos et al., 2002). Neste estudo, as doses utilizadas e o período de administração não resultaram em efeitos anorexigênicos significativos associados à exposição isolada ao etanol ou à nicotina. Contudo, quando as duas drogas foram administradas simultaneamente, a redução de massa corporal ficou evidente. Assim, sugerimos que, com a administração concomitante das drogas, houve soma dos mecanismos associados à redução de massa corporal mediados pela nicotina e pelo etanol.

Para a relação ingesta líquida/massa corporal, houve uma diminuição desta proporção de forma tratamento-dependente. Esta diminuição foi encontrada nos grupos NIC e NIC+ETOH em comparação ao grupo VEH. Uma vez que as diferenças na relação ingesta líquida/massa corporal foram encontradas somente nos grupos que receberam nicotina, é provável que tal redução possa ser explicada por uma aversão ao sabor da solução de nicotina. Outra possível explicação para esta redução da ingesta líquida nestes grupos de tratamento pode ser devido à nicotina ter uma ação antidiurética, provavelmente, pela estimulação hipotalâmica, que resulta na liberação do hormônio antidiurético vasopressina pela glândula pituitária posterior (Burn et al., 1945; Feldberg et al., 1975; Finch et al., 2004; Pomerleau, 1992). Uma vez que as injeções de etanol não influenciaram a determinação do consumo de líquido neste modelo de exposição e a análise bidimensional demonstrou que a redução da ingesta/massa refletiu a soma dos efeitos da nicotina e do etanol, sugerimos que o efeito anorexigênico da nicotina foi mandatório quando na dupla exposição.

4.3 Medidas séricas de cotinina e etanol

No presente estudo, diariamente, uma solução de 50µg/ml de nicotina em 2% de sacarina foi oferecida *ad libitum* como única fonte de líquido, enquanto injeções i.p. de uma solução (v/v) de 2 g/Kg de etanol foram administradas em dias alternados. Este desenho experimental teve como objetivo mimetizar o padrão de consumo dessas drogas por adolescentes humanos. Neste sentido, a avaliação do nível de exposição à nicotina e ao etanol

tem fundamental importância para a interpretação dos nossos resultados, bem como para a possibilidade de sua generalização para a população humana.

Os níveis de cotinina não diferiram entre os grupos NIC e NIC+ETOH, da mesma forma, a concentração de etanol no sangue não foi afetada pela exposição à nicotina. Estes resultados corroboram dados recentes do nosso laboratório utilizando a cepa C57Bl/6, que também demonstraram que níveis plasmáticos de cotinina não diferem entre camundongos expostos à nicotina e nicotina+etanol e, da mesma maneira, os níveis de etanol não são afetados pela exposição concomitante à nicotina (Ribeiro-Carvalho et al., 2009). Em conjunto, nossos resultados indicam que interações farmacocinéticas entre nicotina e etanol não são capazes de explicar os resultados encontrados sobre o desempenho cognitivo desses animais em uma tarefa visuoespacial e no sistema glutamatérgico.

No presente estudo, mantendo o desenho experimental previamente utilizado com animais da cepa C57Bl/6 (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007, 2008; Manhães et al., 2008; Ribeiro-Carvalho et al., 2008 e 2009), escolhemos camundongos Suíços para dar livre acesso à uma solução de nicotina em água para beber e uma injeção (i.p.) de etanol em dias alternados. A relação entre os padrões de consumo de bebidas alcoólicas e cigarros de tabaco e os índices de adição tem sido avaliada em diversos estudos (Stratton et al., 2001; Hillemacher et al., 2006). De fato, a gravidade da adição tem sido associada com os níveis de alguns biomarcadores (Pronko et al., 1997; Rubinstein et al., 2007). Neste sentido, os níveis de exposição à nicotina e ao etanol em modelos animais são uma importante ferramenta na interpretação de resultados e reforçam a possibilidade de generalizações para a população humana.

Nossos resultados indicam que a concentração de nicotina usada na solução de consumo dos animais gerou níveis plasmáticos de cotinina (principal metabólito da nicotina) equivalentes aos encontrados em adolescentes humanos fumantes leves (menos de 10 cigarros/dia) (Binnie et al., 2004; Parzynski et al., 2008). Em um mesmo modelo de exposição à nicotina utilizando a cepa C57Bl/6 (Ribeiro-Carvalho et al., 2009) a concentração plasmática de cotinina atingiu quase o dobro do valor encontrado em camundongos Suíços, contudo, em ambos os trabalhos, a metabolização da droga não foi afetada pela exposição concomitante ao etanol. A falta de estudos utilizando a linhagem Suíço em modelos de exposição via oral à nicotina não nos permite afirmar quais os fatores seriam responsáveis pelas diferenças nos resultados. No entanto, é importante ressaltar que mesmo um baixo consumo de cigarros (até 4 por dia) pode levar a graves problemas de saúde e aumentar as chances de morte precoce (CDC, 2007). Além disso, em poucos dias de fumo ocasional, o

adolescente já pode apresentar sintomas de dependência (DiFranza et al., 2000; O'Loughlin et al., 2002) de tal forma que o tabagismo é considerado doença pediátrica provocada pela nicotina (Taioli & Wynder, 1991). A dose de etanol ora utilizada gerou uma concentração plasmática dentro do encontrado em adolescentes humanos que teriam consumido uma dose alta de etanol (Dubowski, 1985). No entanto, os resultados apresentados representam o dobro dos valores encontrados em camundongos C57Bl/6 em um mesmo desenho experimental (Ribeiro-Carvalho et al., 2009). Os resultados do presente estudo mostram que o desenho experimental utilizado aqui e em trabalhos prévios (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007, 2008; Manhães et al., 2008; Ribeiro-Carvalho et al., 2008), embora com uma cepa heterogâmica, pode simular um padrão de exposição à nicotina e ao etanol observado para adolescentes humanos.

Tem sido demonstrado que os níveis plasmáticos de etanol são reduzidos em animais expostos concomitantemente à nicotina (Chen & Harle, 2005; Gilbertson & Barron, 2005). Assim, seria possível supor que interações farmacocinéticas entre etanol e nicotina poderiam afetar os resultados da exposição combinada a estas drogas. No entanto, tais efeitos foram descritos apenas em animais que receberam etanol via oral, o que parece ser devido a um atraso no esvaziamento gástrico induzido pela nicotina (Scott et al., 1993; Chen & Harle, 2005). No presente estudo, os níveis plasmáticos de cotinina não diferiram entre animais expostos a NIC e NIC+ETOH, assim como os níveis de etanol em sangue não foram afetados pela exposição à nicotina. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios, que demonstraram que as concentrações i.p. de etanol não são afetadas pela exposição crônica à nicotina (Parnell et al., 2006) e que esta não afeta a taxa de eliminação do etanol (Collins et al., 1988). Desta forma, nossos achados indicam que as interações farmacocinéticas nicotina-etanol não são capazes de explicar os achados comportamentais e bioquímicos quando na exposição combinada.

4.4 Labirinto Aquático de Morris

Para os animais avaliados durante o período de exposição às drogas (PN38 a PN45), nossos resultados mostraram uma redução do tempo despendido para encontrar a plataforma durante as sessões de treinamento, denotando o aprendizado da tarefa. No entanto, este desempenho foi diferentemente afetado pelo sexo, onde machos foram mais rápidos para localizar a plataforma que fêmeas, bem como pelo tratamento, tendo, os grupos expostos ao

etanol, um prejuízo significativo na execução da tarefa visuoespacial. Ademais, a diferença entre os sexos não foi associada ao tratamento. Na sessão de prova, assim como nas sessões de treinamento, somente os grupos ETOH e NIC+ETOH apresentaram déficits na formação do mapa visuoespacial, visto que o número de investidas sobre a região em que a plataforma (quadrante PLAT/SO) estava colocada durante o período de treinamento não diferiu significativamente das regiões homólogas (quadrantes NO, NE e SE). Tomados em conjunto, os dados do período de treinamento e da sessão de prova sugerem que a administração do etanol ao longo da adolescência, isoladamente e em associação à nicotina, leva a prejuízos da formação e consolidação da memória visuoespacial. O efeito aditivo identificado na análise bidimensional sugere que o grupo que recebeu o etanol concomitantemente à nicotina teve pior desempenho do que o grupo que somente recebeu etanol. Contudo, a ausência de diferenças entre o grupo exposto somente à nicotina e o grupo veículo sugere um papel mandatório do etanol quando na dupla exposição.

Na abstinência das drogas (PN50 a PN57), pode ser observado o aprendizado da tarefa visuoespacial através da queda da latência para localização da plataforma durante as sessões de treinamento. Entretanto, não foram observadas diferenças de desempenho associadas ao sexo, nem entre os grupos de tratamento. Este resultado demonstra a reversão dos efeitos da administração do etanol, isolada ou em concomitância à nicotina, sobre a formação e consolidação de memória no período de exposição às drogas. Na sessão de PROVA, contudo, o grupo exposto à nicotina somente e o grupo que recebeu nicotina e etanol tiveram seu desempenho significativamente afetado pela exposição às drogas. Diferentemente do período de exposição às drogas, em que o etanol tinha uma ação principal sobre os resultados, estes dados sugerem que, no período de retirada, a nicotina é o principal mediador dos prejuízos causados à consolidação deste tipo de tarefa de memória.

Inúmeros estudos em roedores têm avaliado a memória visuoespacial empregando diferentes tipos de testes de labirinto. O LAM tem sido largamente utilizado nas últimas três décadas (Filgueiras et al., 2010; Grant et al., 1992; Scerri et al., 2006; Wishaw et al., 1987) como uma importante ferramenta para melhor se compreender os mecanismos bioquímicos e estruturais da memória (Burwell et al., 2004; Cain et al., 2006; Dash et al., 2004; Harker & Wishaw, 2004). O teste consiste em, ao longo de um determinado número de tentativas e sessões de treinamento, um animal navegar em uma piscina e localizar uma plataforma submersa baseando-se em pistas visuais localizadas fora da piscina (Morris, 1984). O aprendizado no LAM é considerado mais rápido que em outros testes de labirinto devido ao seu estímulo aversivo, com aquisição em apenas 5 dias de treinamento (Hodges, 1996).

Porém, os resultados obtidos numa tarefa que requeira muitas sessões ou sessões longas para sua aprendizagem são considerados de difícil interpretação, uma vez que envolvem a sobreposição de diferentes fases da consolidação entre si e/ou com processos de reaquisição ou evocação (Izquierdo, 2011).

No que diz respeito aos animais experimentais utilizados no LAM, fatores como massa corporal, idade e sexo devem ser levados consideração, pois podem influenciar a velocidade da natação (Wenk, 1998), assim como diferenças espécie-específicas e mesmo entre linhagens de uma mesma espécie (Crawley, 1996; Lipp & Wolfer, 1998). No presente estudo, foi utilizada uma linhagem de camundongos heterogênicos (Suíço). Muito embora o LAM tenha sido desenvolvido inicialmente para ser realizado com ratos (Brandeis et al., 1989), várias espécies de mamíferos, principalmente camundongos, vem sendo testadas neste dispositivo (Lipp & Wolfer, 1998). Embora não sejam nadadores naturais e mostrem uma resposta comportamental muito diferente de ratos quando expostos ao ambiente do LAM, camundongos têm sido usados por vários autores e com sucesso. Isto porque, apesar de camundongos possírem um pior desempenho no LAM quando comparados a ratos, já foi demonstrado que esta diferença se deve a uma menor habilidade natatória e não a uma menor capacidade neurocognitiva desses animais (Lipp & Wolfer, 1998). Um trabalho em que camundongos C57BL/6 foram comparados à cepa de ratos Long-Evans em uma variedade de tarefas de aprendizagem em ambiente terrestre e aquático, foi observado um desempenho semelhante entre essas espécies quando em ambientes secos, no entanto, o mesmo não ocorreu em ambientes aquáticos (Whishaw & Tomie, 1996). Além disso, é importante considerar que camundongos de diferentes cepas podem apresentar semelhanças e peculiaridades relativas ao desempenho no teste de labirinto aquático de Morris (Francis et al., 1995; Royle et al., 1999).

Nossos resultados indicaram uma diferença sexo-dependente não relacionada ao tratamento no comportamento natatório dos animais testados durante o tratamento. De acordo com estudos prévios, fatores hormonais (Parsons et al., 2004; Postma et al., 2000) e evolutivos (Gaulin & FitzGerald, 1990) implicam em diferenças relacionadas ao sexo no desempenho de tarefas visuoespaciais tanto em humanos (Aleman et al., 2004; Goldstein et al., 1990; Stumpf, 1993) quanto em diferentes espécies de roedores (Galea et al., 1994, 1996; Perrot-Sinal et al., 1996a; Williams & Meck, 1991), o que poderia justificar, ao menos em parte, este resultado.

O comportamento tigmotático também poderia explicar as diferenças entre sexos encontradas em nossos resultados. A tigmotaxia é uma resposta comportamental

frequentemente observada quando um animal é introduzido em um ambiente novo, potencialmente arriscado e estressante (Treit & Fundytus, 1989) e pode ser avaliada pelo tempo gasto pelo animal se locomovendo próximo às paredes do dispositivo de teste (Thiel et al., 1999) ou pelo número de vezes em que o animal encosta as vibrissas na parede (Luhmann et al., 2005). Fêmeas evidenciam níveis mais elevados de tigmotaxia que machos (Kvist & Selander, 1994; Perrot-Sinal et al., 1996b) e tal comportamento é claramente observado no início das sessões de treinamento em testes de labirinto aquático (Sakic et al., 1993; Saucier & Cain, 1995; Sei et al., 1992), sendo considerado um interferente no desempenho dos animais. Além disso, já foi documentado que camundongos boiam quando no LAM (Nakazawa et al., 2003; Westerman et al., 2002). Este outro comportamento poderia levar a um aumento da latência para encontrar a plataforma sem, no entanto, estar relacionado a um déficit cognitivo primário.

O presente trabalho também demonstrou que o desempenho dos camundongos no LAM, tanto nos treinamentos quanto na sessão de prova foi afetado pelo etanol, mas não pela nicotina, quando administrados isoladamente durante a adolescência e ainda um pior resultado decorrente da dupla exposição. Estes achados estão em acordo com um estudo anterior de nosso laboratório em que efeitos idênticos foram encontrados em camundongos C57Bl/6 submetidos ao mesmo modelo de exposição à nicotina e etanol testados na esQUIVA passiva (Abreu-Villaça et al., 2007). Já foi demonstrado que, tanto em humanos como em roedores, a nicotina melhora a função cognitiva, como atenção e memória (Bancroft & Levin, 2000; Brioni et al., 1997; Decker et al., 1995; Levin & Simon, 1998; Marti Barros et al., 2004; Whitehouse & Kalaria, 1995), com um importante papel na retenção da memória espacial (Sharifzadeh et al., 2005c). Em relação à memória de curto prazo, o pico dos efeitos da nicotina é visto durante o tratamento na fase adulta (Ernst et al., 2001; Hefco et al., 2004; Levin & Rezvani, 2000; Rezvani & Levin, 2003). Interessantemente, em contraste a estes achados, mas em consonância com os de Hagan *et al.* (1989) e Attaway *et al.* (1999), nossos resultados indicam que a exposição somente à nicotina durante a adolescência não promove benefícios cognitivos. Foi descrito que adolescentes fumantes têm um pobre desempenho em tarefas de memória operacional tanto na exposição quanto na retirada da droga (Jacobsen et al., 2005). Estes resultados fornecem ainda mais evidências de que adolescentes apresentam uma resposta peculiar à nicotina quando comparados aos adultos (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004; Slotkin, 2000).

Em relação aos efeitos do etanol na memória, nossos resultados estão em acordo com estudos prévios que mostram uma deficiência no desempenho da tarefa da esQUIVA passiva

quando a droga é aplicada antes de cada dia de teste (Bammer & Chesher, 1982). Para testes de aprendizado por condicionamento, tem sido sugerido que o etanol altera a atenção necessária ao processo (Steele-Russell et al., 2006). O que também pode ser reiterado no presente estudo é que os camundongos não estavam sob efeito agudo da droga durante as sessões de teste (Parnell et al., 2006), descartando a possibilidade de déficits motores atuarem como um viés de confundimento. Estes achados estão também em acordo com outros estudos que avaliaram o desempenho de roedores em atividades visuoespaciais, com prejuízos significativos em adolescentes, mas não em adultos expostos ao etanol (Hefner & Holmes, 2007; Markwiese et al., 1998; Rajachandran et al., 1993; Sircar et al., 2009), reforçando que a adolescência é um período de maior suscetibilidade a efeitos deletérios desta droga.

Em relação à dupla exposição, a nicotina tem sido mostrada como uma inibidora da neurotoxicidade induzida pelo etanol em cultura de células corticais e cerebelares (Tizabi et al., 2003, 2004). De fato, a coadministração de nicotina e etanol em adultos representa a oposição do efeito cognitivo de uma droga em relação ao efeito da outra (Gould & Lommock, 2003; Rezvani & Levin, 2002, 2003; Tracy et al., 1999). Apesar de estudos prévios demonstrarem um efeito benéfico da nicotina em contraste aos danos promovidos pelo etanol, no presente estudo, os efeitos do tratamento combinado refletiram a soma dos efeitos da exposição individual à nicotina e ao etanol, com um pior resultado quando na dupla exposição durante a adolescência. Desta maneira, nossos achados oferecem evidências de que a adolescência é uma janela crítica para a interação entre nicotina e etanol, com efeitos únicos quando comparados à idade adulta. Ainda, é possível especular que, na exposição durante a adolescência, a associação do consumo de tabaco e de álcool não possa ser explicada pela ação da nicotina em reverter os danos causados pelo etanol na função cognitiva.

No período de retirada, ainda que estudos prévios tenham mostrado que a exposição ao etanol em ratos adolescentes, mas não em adultos, promova prejuízos persistentes na formação da memória (Barron et al., 2005; Sircar & Sircar, 2005), outros estudos mostram que a retirada de etanol durante a adolescência não afeta a memória (Popovic et al., 2004). Nossos resultados seguem a linha dos achados de Popovic e colaboradores (2004) uma vez que não são encontradas diferenças na performance cognitiva de camundongos tratados durante o período de retirada do etanol. Esses achados sugerem mudanças reversíveis na memória e sugerem que adolescentes são menos sensíveis à deterioração na memória visuoespacial promovida pela retirada do etanol. Os déficits cognitivos decorrentes do uso do etanol na adolescência aparentam ser dependentes do padrão de exposição, uma vez que períodos mais longos de tratamento com etanol (Farr et al., 2005) e com doses mais altas

(White & Swartzwelder, 2004; Parsons & Nixon, 1998) causaram déficits permanentes e danos neuronais em roedores e em humanos.

Embora não tenham sido observadas diferenças no desempenho dos grupos experimentais durante as sessões de treinamento ao longo do período de abstinência, a sessão de prova indicou um prejuízo na retenção da memória dos grupos expostos à nicotina. A retirada da nicotina causa efeitos semelhantes aos encontrados em um modelo de exposição com altas doses da droga, que induziu a déficits na retenção da tarefa visuoespacial quando avaliada na sessão de prova (Scerri et al., 2006). Foi mostrado por Jacobsen e colaboradores (2005) que adolescentes humanos que fumavam tabaco diariamente experimentavam deficiências agudas na memória verbal e recente durante a retirada da droga.

Semelhante à exposição isolada, a associação de nicotina com o etanol promoveu um resultado deletério na retenção do aprendizado. Este resultado corrobora dados prévios da literatura que contrastam efeitos cognitivos de nicotina e de etanol na fase adulta (Gould & Lommock, 2003; Rezvani & Levin, 2002, 2003; Tracy et al., 1999). Assim, apesar de alguns estudos já terem demonstrado a atividade neuroprotetora da nicotina em relação aos efeitos deletérios do etanol (Gould & Lommock, 2003; Prendergast et al., 2000; Tracy et al., 1999), não encontramos evidências de que a nicotina neutralize os efeitos negativos do etanol. Contrariamente, nossos resultados sugerem que a coadministração de etanol e nicotina durante a adolescência pode ter efeitos persistentes mesmo que com a retirada das drogas.

4.5 Teste de campo aberto e de locomoção forçada em cilindro giratório

Não foram encontradas diferenças significativas na atividade locomotora dos animais em nenhum dos parâmetros avaliados no campo aberto quando estes foram testados na adolescência – durante a exposição à nicotina e/ou ao etanol. O mesmo se deu na abstinência das drogas, quando os animais já atingiram a idade adulta. No teste de locomoção forçada em cilindro giratório, todos os grupos de tratamento aumentaram igualmente o tempo de permanência sobre a plataforma giratória ao longo das tentativas em PN45 e em PN57 de modo que não foram observadas alterações significativas no equilíbrio e na coordenação motora dos animais.

Os efeitos motores do etanol são bem estabelecidos em humanos: variam de acordo com a dose e a cronicidade da exposição à droga (Carpenter, 1962; Tafiand & Kasschau, 1965), incluem déficits na coordenação motora, aumento do tempo de reação e perda de

equilíbrio e são observados quando o organismo está submetido à ação direta do etanol (Wallgren & Barry, 1970). Além disso, apesar de tais efeitos terem sido bem demonstrados em roedores (Boyce-Rustay & Holmes, 2006; Little et al., 1996; Quoilin et al., 2010; Silveri & Spear, 1998; White et al., 2002), a sensibilidade à droga parece sofrer uma grande variabilidade em função das diferenças espécie/cepa-específicas, bem como do modelo de exposição empregado (Boyce-Rustay & Holmes, 2006; Çelik et al., 2005; Hefner & Holmes, 2007). Apesar de estudos prévios terem demonstrado uma maior suscetibilidade de animais adolescentes a alterações na atividade locomotora quando comparados a animais adultos (Quoilin et al., 2010; Stevenson et al., 2008), nos animais testados no período de tratamento, a última injeção de etanol havia sido administrada 24 horas antes do teste de modo que os sintomas físicos decorrentes da ação direta da droga não se aplicam a este caso. Deste modo, não foram observados efeitos locomotores decorrentes do uso nem da abstinência do etanol em nossos resultados.

Em ratos adolescentes, a exposição à nicotina induz um efeito locomotor estimulante enquanto, em animais adultos, há uma depressão da atividade motora (Belluzzi et al., 2004, Cao et al., 2007; Elliott et al., 2004, Vastola et al., 2002). Os efeitos da nicotina vêm sendo estudados na doença de Parkinson/Parkinsonismo: tanto em humanos como em modelos animais, a nicotina promove uma diminuição de sintomas clássicos da doença, como a bradicinesia, o tremor e a rigidez (Balfour et al., 2000 Marks & Collins, 1982; Moll, 1966; Quik et al., 2007; USDHHS, 1988a). Entretanto, assim como para o etanol, o presente estudo não encontrou efeitos da nicotina na deambulação e na coordenação/ equilíbrio dos animais, em acordo com estudos prévios onde a ação estimulante da nicotina não foi observada para ambos os testes comportamentais em questão (Al-Rejaie & Dar, 2006b; Trauth et al., 2000).

Em relação à dupla exposição, foi demonstrado que a exposição prévia a estas drogas afeta locomoção no teste de campo aberto na adolescência (Gilbertson & Barron, 2005), bem como que a nicotina atenua a ataxia promovida pelo etanol (Al-Rejaie & Dar, 2006a, b). No entanto, não foram encontradas alterações no comportamento motor dos animais tanto na vigência quanto na abstinência das drogas. A ausência de alterações motoras em virtude do tratamento com nicotina e/ou etanol, tanto na atividade de deambulação quanto no equilíbrio e coordenação, sugere que os resultados obtidos no LAM não sejam devidos a déficits motores, mas, sim, às alterações dos mecanismos de formação/consolidação de memória visuoespacial.

4.6 Análise bioquímica do sistema glutamatérgico

Na avaliação dos mecanismos de transporte de aminoácidos excitatórios, observamos uma redução significativa da captação de [3H] D-aspartato quando na ausência de sódio, bem como a necessidade de uma temperatura e tempo de incubação ótimos para que o transporte do AAE ocorra. Elaboramos uma curva temporal da captação do aminoácido excitatório com o objetivo de estabelecer qual seria o tempo ideal de incubação com AAE para alcançarmos um transporte máximo e/ou estabilizado. A partir deste resultado elegemos o tempo de 60 minutos como o tempo ideal de incubação com o radioativo para os nossos próximos experimentos. O transporte de glutamato é sensível à temperatura (Kanner & Marva, 1982). A sódio-dependência demonstra que a estrutura envolvida neste processo é um transportador de alta afinidade. Tomados em conjunto, estes resultados caracterizam algumas propriedades físicoquímicas dos transportadores de AAE (Danbolt, 2001).

A captação de AAE no hipocampo permaneceu constante ao longo do desenvolvimento. Apesar das alterações robustas que ocorrem no hipocampo durante o período prepuberal, com intensa neurogênese, aumento da densidade dendrítica (He & Crews, 2007; Swann et al., 1999; Yildirim et al., 2008) e um aumento do volume hipocampal sexo-dependente durante o processo de maturação (Durstun et al., 2001; Koshibu et al., 2004; Yildirim et al., 2008), tais mudanças estruturais parecem não afetar o transporte de AAE ao longo do desenvolvimento. Este resultado sugere que as alterações encontradas na atividade e na expressão dos transportadores sejam devidas aos efeitos da exposição às drogas.

No presente trabalho, observamos que a administração isolada e a coadministração de nicotina e etanol diminuíram significativamente a captação de [3H] D-aspartato no hipocampo de camundongos adolescentes, com a reversão destes efeitos quando avaliados dois diferentes períodos de retirada das drogas. Nosso estudo também demonstrou um papel mandatório do GLAST/EAAT1 no transporte de [3H] D-aspartato no hipocampo, de forma que, além da atividade dos transportadores glutamatérgicos hipocampais como um todo, investigamos os efeitos da nicotina e do etanol na expressão deste transportador glial. Nossos resultados mostraram que a exposição a estas drogas durante a adolescência leva a uma redução importante da expressão de GLAST/EAAT1, com um efeito mais proeminente quando na exposição isolada a ambas as drogas. Na abstinência, foi observada uma discreta recuperação destes efeitos para o grupo que recebeu nicotina mais etanol, e de quase 50% para os grupos que receberam as drogas isoladamente. O transporte de glutamato pode ser regulado, aguda ou cronicamente, por diversos mecanismos. Desta forma, propomos que nicotina e etanol atuem

como agentes moduladores do transporte de AAE e que as alterações ora encontradas estejam relacionadas com os resultados obtidos na execução da tarefa visuoespacial no LAM.

Há evidências de que a ativação dos receptores NMDA estimula a atividade de proteínas cinase (Yamauchi, 2005; Strack et al., 1997; Gardoni et al., 2001), cruciais para a formação de LTPs (Errington et al., 1987; Morris et al., 1990a,b; Shankar et al., 1998) e que modulam a atividade e a expressão dos transportadores de AAE através de sítios de fosforilação presentes na estrutura dos EAATs (Nieoullon et al., 2006; Gegelashvili & Schousboe, 1997). De fato, a ativação da PKC é relacionada como estímulo para a captação de glutamato (Casado et al., 1993; Dowd & Robinson, 1996), muito embora, por vezes, estudos mostrem um papel antagônico desta proteína: de um modo geral, a fosforilação de transportadores de AAE por PKC leva à internalização do transportador EAAT1; à diminuição da atividade do EAAT2 em até 25%, sem nenhuma alteração na expressão do transportador (Kalandadze et al., 2002); ao aumento do EAAT3 (González & Robinson, 2004), além de haver uma forte associação entre a PKC e o EAAC1/EAAT3 em neurônios hipocámpais (Fournier et al., 2004; González et al. 2002). Tal interação contribuiria para a adequação da eficiência do transporte à demanda celular (Davis et al., 1998). Por sua vez, a PKA, envolvida na modulação da excitabilidade sináptica, da plasticidade neural, e com uma participação importante no processo de formação e consolidação das memórias (Benito & Barco, 2010; Knoll & Nordheim, 2009; Zhang et al., 2011), também participa na regulação da expressão dos transportadores gliais GLAST/EAAT1 e GLT-1/EAAT2 (Hansson & Ronnback, 1991; Leonova et al., 2001). Particularmente, a inibição de PKA leva a aumento rápido e robusto da eficiência do transporte de glutamato por um aumento na expressão de GLAST/EAAT1 na superfície celular (Adolph et al., 2007).

A formação de LTP na área CA1 do hipocampo tem sido associada ao aumento da captação de glutamato e ao aumento da expressão de transportadores neuronais EAAT3/EAAC1 na superfície celular (Levenson et al., 2001). Camundongos *knockout* para os genes GLT-1/EAAT-2 (Katagiri et al., 2001) e para GLAST/EAAT1 (Karlsson et al., 2009) apresentam prejuízos na expressão de LTP. Tomados em conjunto, estas evidências reforçam a ideia de que a exposição a substâncias que estimulem ou inibam a transmissão glutamatérgica, como nicotina e etanol, levem a alterações da eficiência dos EAATs, com repercussões nos processos de formação de memória.

É bem estabelecido que o etanol tem um impacto direto sobre a transmissão glutamatérgica através do bloqueio dos receptores NMDA (Bellinger et al., 2002; Lovinger et al., 1989; Otton et al., 2009) com uma consequente suprarregulação (Nagy et al., 2005;

Trujillo & Akil, 1995), sugerindo que a exposição crônica ao etanol leva a mudanças funcionais destes receptores (Khanna et al., 1991, 1992a, 1992b, 1993), como na formação do LTP devido à redução da ativação dos NMDA-R em neurônios hipocâmpais (Shen et al., 2010; Swartzwelder et al., 1995b). Dentre os períodos de desenvolvimento, a adolescência parece ser o de maior sensibilidade aos efeitos do etanol (Adriani et al., 2004; Bortolotto et al., 1999; Swartzwelder et al., 1995a) quando comparados a animais neonatos (Marinelli et al., 2005) ou adultos (Swartzwelder et al., 1995; Li et al., 2002): foi demonstrado que o etanol, mediado pela atenuação do potencial pós-sináptico de receptores NMDA na área CA1 do hipocampo, prejudica os mecanismos de memória em ratos prepúberes (Swartzwelder et al., 1995a). Por outro lado, a retirada do etanol leva a um aumento da transmissão glutamatérgica (Tsai et al., 1998) por um incremento do número de NMDA-R (Hoffman et al., 1992; Snell et al., 1993; Tsai et al., 1998). Além disso, tem sido relatado que os níveis extracelulares de glutamato também estão aumentados tanto em humanos alcoólicos abstinentes quanto em ratos com sintomas físicos de retirada da droga (Rossetti & Carboni, 1995; Tsai et al., 1998). Esta reversão dos efeitos do etanol no sistema glutamatérgico parece implicar também na performance cognitiva, visto que sua retirada facilita os processos de memória, como no condicionamento pelo medo (Bertotto et al., 2006).

Em relação ao transporte de AAE, foi demonstrado que o etanol medeia seus efeitos no EAAT3 via PKC (Kim et al., 2005). Estudos em cultura de células demonstraram que a exposição aguda aumenta a atividade de EAAT3 em níveis clinicamente relevantes, de modo a sugerir que este transportador induza alguns dos efeitos centrais do etanol como sedação e alterações cognitivas (Kim et al., 2003), enquanto a exposição crônica reduz a atividade do EAAT3 de maneira tempo-dependente e reversível (Kim et al., 2005). O tratamento com etanol em ratos neonatos não afetou os EAATs durante o período de exposição, contudo, na avaliação dos animais na idade adulta, abstinentes desde PN8, houve uma suprarregulação de EAAT1, EAAT2 e EAAT3 no hipocampo, com prejuízos na retenção quando avaliados no LAM (Zink et al., 2011).

Em acordo com o estudo de Kim e colaboradores (2005), nossos resultados mostraram uma redução significativa da atividade dos EAATs ao final do período de tratamento com reversão parcial deste efeito na retirada do etanol. A redução da eficiência do transporte durante a exposição pode ser devida à inibição encontrada, de cerca de 40%, na expressão do transportador GLAST/EAAT1. Ainda, o bloqueio de receptores NMDA causado pela exposição ao etanol (Bellinger et al., 2002; Lovinger et al., 1989; Otton et al., 2009) pode ter atuado como um inibidor dos EAATs, com um efeito importante sobre o EAAT1. O etanol

provoca uma depleção da transmissão glutamatérgica, com reconhecido prejuízo ao processo de formação de memória (Shen et al., 2010; Swartzwelder et al., 1995a, b), o que sugere uma relação entre os achados bioquímicos e os resultados no LAM, onde, no período de administração do etanol, houve um pior desempenho para a aquisição e a retenção da tarefa visuoespacial.

De fato, a relação entre receptores NMDA e EAATs é uma via de mão dupla: enquanto estes receptores modulam a atividade e a expressão dos transportadores de AAE (Nieoullon et al., 2006; Gegelashvili & Schousboe, 1997), os EAATs, por sua vez, atenuam as funções mediadas pelo NMDA-R (Bunch et al., 2009). Desta forma, a diminuição da eficiência da captação de [3H] D-aspartato e da expressão de EAAT1 e a relação deste resultado com o pior desempenho dos animais testados durante o tratamento com etanol pode acontecer da seguinte forma: o bloqueio de NMDA-R promovido pelo uso do etanol, que, reconhecidamente, induz prejuízos de memória (Swartzwelder et al., 1995a), leva a uma redução da estimulação dos EAATs; no entanto, a diminuição da função dos EAATs, como forma de reduzir compensatoriamente a inibição da função deste receptor, já prejudicada pelo etanol, não é suficiente para reverter os efeitos da droga nos receptores e no comportamento.

Na retirada, a ativação dos NMDA não mais bloqueados pelo etanol e suprarregulados pelo uso crônico da droga (Nagy et al., 2005; Trujillo & Akil, 1995), torna necessário o aumento da captação de AAE no sentido de prevenir um quadro excitotóxico (Rubio et al., 2011; Ward et al., 2008; Hoffman, 1995), o que justificaria a recuperação da atividade dos EAATs e da expressão de EAAT1 e a reversão dos danos cognitivos do etanol ao longo do tratamento. No período de abstinência, enquanto Zink e colaboradores (2011) demonstraram uma suprarregulação do EAAT1 no hipocampo, nós encontramos apenas uma recuperação parcial da redução da expressão dos EAATs. Uma vez que a retirada do etanol leva a um aumento do glutamato extracelular (Rossetti & Carboni, 1995; Tsai et al., 1998) e que a superfície celular é sensível à presença do glutamato, de modo a aumentar sua captação através de um aumento da expressão de GLAST/EAAT1 (Duan et al., 1999; González & Ortega, 2000), esta pode ser uma possível explicação para a recuperação, ainda que incompleta, da expressão deste transportador glial no grupo exposto somente ao etanol. Quanto ao retorno da atividade aos níveis normais, é provável que outros EAATs que também sofrem suprarregulação na retirada do etanol (Zink et al., 2011) contribuam para esta restituição da eficiência do transporte de AAE. Foi sugerido que uma captação eficiente seja necessária a uma boa função cognitiva (Katagiri et al., 2001; Karlsson et al., 2009; Levenson et al., 2001), o que vai ao encontro do resultado comportamental encontrado no LAM, em

que, na retirada, o grupo exposto somente ao etanol apresentou uma recuperação dos danos e um desempenho normal da tarefa. Todos estes efeitos na neurotransmissão glutamatérgica sugerem que o etanol pode ser considerado um modular do sistema de transporte de AAE.

No que diz respeito aos efeitos da nicotina, sabe-se que a administração da droga afeta os mecanismos de atenção e memória no hipocampo através da modulação excitatória – a nicotina promove um aumento da transmissão glutamatérgica (McGehee et al., 1995; Gray et al., 1996) estimulando a liberação de glutamato (Fedele et al., 1998). De fato, a nicotina induz um aumento da transmissão sináptica no hipocampo pela ativação de nAChRs pré-sinápticos (Wonnacott, 1997) com extensiva interação funcional com os receptores NMDA (Jain et al., 2008). Estudos têm sugerido que tal estimulação ocorra através dos subtipos de nAChRs $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$: estes receptores modulam a permeabilidade celular ao Ca^{2+} , que interfere nos processos de plasticidade necessários à formação de memória (Barrantes et al., 1994, 1995; Broide & Leslie, 1999; Papke et al., 2001; Perry et al., 2002; Sorenson et al., 1998; Wonnacott, 1997). Embora não haja dados na literatura que evidenciem a ação da nicotina sobre os EAATs, além da estimulação glutamatérgica causada pela droga, que sugere um estímulo do transporte de AAE, a interação dos nAChRs com proteínas cinase também fornece subsídios da modulação dos transportadores pela nicotina.

O presente trabalho demonstrou uma redução importante da atividade e da expressão dos transportadores no hipocampo durante a adolescência. Apesar de este quadro representar um resultado similar ao do grupo que sofreu a exposição somente ao etanol, a nicotina não desencadeou déficits de memória no período de tratamento. Uma possível explicação para a interação destes resultados bioquímicos e comportamentais seria seguindo a linha de que possíveis deficiências na memória associadas às alterações no transporte de AAE fossem compensadas através da estimulação dos receptores nicotínicos colinérgicos, mediadores celulares primários dos efeitos desta droga (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004), fortemente atrelados a funções cognitivas (Mathews et al., 1974; Nadler et al., 1974; Zahalka et al., 1993) dado que a atividade dos nAChRs contribui para a indução de LTP (Fujii et al., 1999; Hunter et al., 1994; Ji et al., 2001; Mann & Greenfield, 2003; Mansvelder & McGehee, 2000; Matsuyama et al., 2000).

Apesar de os níveis de atividade dos transportadores na retirada da nicotina terem sido recuperados, a expressão de GLAST/EAAT1 não foi plenamente restituída, um resultado semelhante aos efeitos da abstinência do etanol. Contudo, a retirada do tratamento com a nicotina causou um déficit da retenção da tarefa no LAM. Já foi descrito que a ativação dos receptores nAChRs no hipocampo desencadeia a liberação de glutamato (Wonnacott et al.,

2002), de forma que a nicotina atua como um modulador das sinapses glutamatérgicas nesta região (Proctor et al., 2011) e que a sua retirada após uma exposição crônica leva a prejuízos da memória hipocampo-dependente (Davis et al., 2005; Levin & Simon, 1998). Assim, uma possível explicação para a conjugação destes resultados pode estar relacionada a alterações da LTP desencadeadas pela abstinência da nicotina. Foi proposto que a exposição aguda e crônica à nicotina facilita a formação de memória através de uma diminuição do limiar para indução de LTP no hipocampo (Fujii et al., 1999) por um aumento da resposta dos NMDA-R por diferentes mecanismos (Yamazaki et al., 2005, 2006a). Yamazaki e colaboradores (2006b) acrescentam que a retirada da droga causa uma flutuação deste limiar nos 4 primeiros dias de retirada, com uma diminuição do incremento da resposta dos NMDA-R induzido pela nicotina, o que, por sua vez, deve ser responsável pelo retorno dos níveis de LTP aos níveis basais após este período. Com base no trabalho de Yamazaki *et al.* (2006b), sugerimos que o desempenho na sessão de prova tenha sido prejudicado por este efeito da retirada da nicotina na indução da LTP.

Como exposto anteriormente, a literatura apresenta inúmeros indícios da oposição de efeitos na liberação de glutamato e na regulação dos receptores NMDA, bem como na memória, pela administração de nicotina e etanol isoladamente. Entretanto, no que diz respeito aos transportadores de AAE, as evidências ainda são insuficientes para se estabelecer um padrão de ação destas drogas neste componente do sistema glutamatérgico. Interessantemente, apesar do antagonismo funcional, de acordo com nosso trabalho, a exposição somente à nicotina e ao etanol provocou efeitos idênticos na eficiência da captação, tanto pela atividade dos transportadores quanto pela expressão de GLAST/EAAT1 em ambos os período avaliados – tratamento e abstinência, muito embora o desempenho dos animais na tarefa visuoespacial não tenha acompanhado a mesma tendência dos resultados bioquímicos. Estes resultados sugerem que outros componentes do sistema glutamatérgico não aferidos no presente estudo, bem como de outros sistemas neurotransmissores, estejam alterados e envolvidos neste processo de modo a complementar esta resposta. Ademais, ainda que a expressão dos demais EAATs não tenha sido o foco de nosso trabalho, é importante lembrar que o uso de nicotina pode afetar, direta ou indiretamente, os demais transportadores de AAE tal como o etanol.

Levando em consideração os dados fornecidos pela literatura no tocante aos efeitos de nicotina e etanol, era esperado que, na dupla exposição, encontrássemos a oposição do efeito destas drogas. No entanto, a redução na captação vista durante a administração das drogas foi da mesma ordem que a observada na exposição de nicotina e etanol isoladamente, enquanto

que a redução na expressão de EAAT1 foi cerca de 50% menor do que a encontrada na exposição isolada. Na retirada das drogas, houve um restabelecimento os níveis de captação de [3H] D-aspartato, bem como da expressão do transportador glial, embora esta não tenha sido completa.

Há uma divergência na literatura no que diz respeito aos efeitos cognitivos da associação entre nicotina e etanol. Quando as duas drogas são administradas em conjunto, a nicotina usualmente melhora (Gould et al., 2001), mas, em alguns casos, potencializa (Rezvani & Levin, 2002) os efeitos deletérios induzidos pelo etanol na função cognitiva. Contudo, também já foi demonstrado que a administração de nicotina, mesmo que em altas doses, não reverte os prejuízos na memória visuoespacial causados pelo bloqueio de NMDA-R pelo seu antagonista dizocilpina, simulando os efeitos do etanol sobre estes receptores (Levin et al., 2003). Agudamente, o etanol diminui a excitabilidade pós-sináptica dos receptores NMDA, enquanto a nicotina aumenta esta resposta. No entanto, um pré-tratamento com etanol atenua os efeitos da nicotina (Proctor et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que a nicotina somada ao etanol provoca danos celulares no hipocampo (Oliveira-da-Silva et al., 2009). Estes achados demonstram que a circuitaria glutamatérgica está implicada nos efeitos da exposição combinada sobre a memória. Embora não haja dados na literatura que estabeleçam a relação entre a dupla exposição e os EAATs, estes resultados sugerem que, mesmo com alterações bioquímicas menos robustas, o couso destas drogas na adolescência causa prejuízos que se estendem até o período de retirada e reforçam a necessidade de mais estudos no sentido de esclarecer seus mecanismos de interação.

É possível que outros sistemas de neurotransmissores expliquem as alterações encontradas nos animais expostos a nicotina e etanol. Nesse sentido, evidências de interações entre estas duas drogas foram descritas para os sistemas colinérgico, GABAérgico e dopaminérgico. De acordo com o descrito acima, o receptor nicotínico é um outro sítio no qual nicotina e etanol podem interagir. É bem estabelecido que a nicotina, como um análogo a acetilcolina, medeia seus efeitos primários atuando em nAChRs (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004) e modula outros neurotransmissores através da ativação destes receptores nicotínicos (Aramakis & Metharate, 1998; Chiodini et al., 1999; Levin & Simon, 1998; Miledi, 1980; Wonnacott, 1997; Yin & French, 2000). Em paralelo, o etanol atua em sistemas neurotransmissores via receptores ionotrópicos (Gonzales & Hoffman, 1991; Samson & Harris, 1992; Scivoletto & Malbergier, 2003; Zaleski et al., 2004) com influência direta na função dos receptores nicotínicos (Castaneda et al., 1996; Eckardt et al., 1998; Grant, 1994). Tanto nicotina (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2004; Flores et al., 1992) quanto etanol (Booker

& Collins, 1997) promovem suprarregulação dos receptores colinérgicos nicotínicos em diversas regiões cerebrais, inclusive tornando-os mais responsivos à nicotina (Dohrman & Reiter, 2003). Além disso, o etanol reforça o fluxo iônico induzido pelo agonista através dos receptores nicotínicos (Aistrup et al., 1999; Cardoso et al., 1999) e aumenta a estimulação dos receptores nicotínicos envolvidos na ativação do sistema mesolímbico dopaminérgico (Soderpalm et al., 2000).

O sistema GABAérgico também está implicado dos processos de formação de memória (Bowery, 1980; Castellano et al., 1989). De fato, alterações da neurotransmissão gabaérgica induzem danos na memória visuoespacial (Izquierdo et al., 1992). Os efeitos amnésicos induzidos por agonistas dos receptores GABAA (Cole, 1986; Kant et al., 1996; McNamara et al., 1993) somados ao fato de que a liberação de GABA no hipocampo de ratos é modulada por nAChRs (Alkondon et al., 1997, 1999), apontam os receptores GABA como um outro mediador das alterações cognitivas promovidas por nicotina e etanol. Os receptores do tipo GABAA medeiam os efeitos de sedação do etanol (Dickerson et al., 2010; Mihic & Harris, 1997) e respondem de modo dose dependente à administração de etanol, com um aumento da sua função (Proctor et al., 2006) e consequente prejuízo à formação de memórias através da inibição de LTPs (Schummers & Browning, 2001). Estes efeitos devem ser mais acentuados quando a exposição à droga ocorre na adolescência, visto que a função GABAérgica no período prepuberal é crítica para a maturação das conexões sinápticas hipocampais (Gao & van den Pol, 2001). Em relação à nicotina, há uma intrínseca relação entre nAChRs e receptores GABA: a nicotina induz modulação sináptica persistente na presença de antagonistas GABAA com reversão de alterações de memória robustas, como as causadas pela doença de Alzheimer (Rosato-Siri et al., 2006). Além disso, grupamentos de receptores GABAA foram localizados próximos a nAChRs, com evidente ação das fibras colinérgicas como moduladores dos terminais GABAérgicos (Liu et al., 2006). Ademais, o uso de antagonistas do receptor GABAB (Bowery et al., 1980) interfere na consolidação e retenção da memória em roedores (Castellano et al., 1989, Swartzwelder et al., 1987) e em humanos, particularmente, quando em combinação com drogas anticolinérgicas (Sandyk & Gillman, 1985).

O sistema dopaminérgico também tem sido apontado como um dos mediadores que mais influencia o aprendizado em tarefas de esquiva inibitória (Jaffard et al., 2001; Myhrer, 2003), visto que a memória recente (Davis et al., 1991) e a aquisição relacionada a estímulo-resposta (Rezayof et al., 2007) e a outros tipos de aprendizado (Di Chiari et al., 2004) é tida como dependente de receptores dopaminérgicos mesocorticolímbicos (Di Chiari et al., 2004;

Mishkin et al., 1984; Packard & Knowton, 2002; Rezayof et al., 2007). A potencialização do desempenho de tarefas visuoespaciais por agonistas dopaminérgicos também aponta para a importância deste sistema neurotransmissor para a consolidação deste tipo de memória (Packard et al., 1994; Hitchcott et al., 1998). A hipoatividade dopaminérgica no córtex pré-frontal leva a déficits de memória recente (Davis et al., 1991). Algo semelhante acontece pelo uso do etanol, que gera um bloqueio da produção dopaminérgica no córtex pré-frontal medial gerando déficits da memória espacial (De Oliveira & Nakamura-Palacios, 2003). Opostamente, a administração de nicotina na periadolescência produz um aumento da arborização dendrítica nos neurônios dopaminérgicos do núcleo accumbens com alterações estruturais persistentes (McDonald et al., 2005). Porém, mais estudos são necessários para a melhor compreensão das funções de controle e mecanismos detalhados da interação dos dois processos, reforçando a consideração de que fumar e/ou beber na adolescência constitui um risco para o desenvolvimento de funções cognitivas.

5 CONCLUSÕES

Com base neste estudo podemos concluir que:

- (1) O uso do etanol na adolescência promove danos na formação da memória visuoespacial de camundongos quando avaliados durante o período de exposição, com um pior desempenho cognitivo quando associado à nicotina.
- (2) Após a exposição ao longo de toda a adolescência, a retirada da nicotina, isolada ou concomitante à retirada do etanol, afeta a retenção de uma tarefa visuoespacial.
- (3) Nicotina e etanol, tanto separadamente quanto em conjunto, alteram o transporte de aminoácidos excitatórios no hipocampo ao final do período de exposição, com recuperação total dos níveis de captação na retirada das drogas, com uma atuação peculiar sobre o transportador glial GLAST/EAAT1, reduzindo sua expressão. Desta forma, sugerimos que os EAATs, sejam um sítio de ação comum a estas drogas e que o hipocampo apresenta suscetibilidade estrutural e funcional à nicotina e ao etanol no período crítico da adolescência, com efeitos da exposição a estas drogas ainda observados na abstinência.

Estes resultados constituem a primeira evidência de que alterações no sistema de transporte glutamatérgico no hipocampo ocorram em consequência à exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência e que tais alterações estejam implicadas nos prejuízos de aquisição e retenção de uma tarefa visuoespacial apresentados no LAM.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Guthierrez M, Medeiros AH, Mattos MA, Pereira M dos, et al. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine Tob Res*, 2010; 12: 776-80.
- Abreu-Villaça Y, Medeiros AH, Lima CS, Faria FP, Filgueiras CC, Manhães AC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. *Behav Brain Res*, 2007; 181: 136-46.
- Abreu-Villaça Y, Nunes F, do E Queiroz-Gomes F, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharm*, 2008; 33: 599-610.
- Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes FE, Dal Monte AP, Filgueiras CC, Manhães AC. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57Bl/6 mice. *Behav Brain Res*, 2006; 167: 175-82.
- Abreu-Villaça Y, Seidler F, Slotkin TA. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology*, 2004; 29: 1440-50.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Qiao D, Tate CA, Cousins MM, Thillai I, et al. Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Neuropsychopharmacology*, 2003a; 28: 1935-49.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. Prenatal nicotine exposure alters the response to nicotine administration in adolescence: effects on cholinergic systems during exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, 2004a; 29: 879-90.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Tate CA, Slotkin TA. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Res*, 2003; 979: 114-28.
- Adolph O, Köster S, R  th M, Georgieff M, Weigt HU, Engele J, et al. Rapid increase of glial glutamate uptake via blockade of the protein kinase A pathway. *Glia*, 2007; 55: 1699-707.
- Adriani W, Chiarotti F, Laviola G. Elevated novelty seeking and peculiar damphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behavioral Neuroscience*, 1998; 112: 1152-66.

Adriani W, Granstrem O, Macri S, Izykenova G, Dambinova S, Laviola G. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology*, 2004; 29: 869-78.

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

Adriani W, Macri S, Pacifici R, Laviola G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology*, 2002; 27: 212-24.

Aggleton JP, Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci*, 1999; 22: 425-89.

Ahmadi S, Zarrindast MR, Nouri M, Haeri-Rohani A, Rezayof A. N-Methyl-D-Aspartate receptors in the ventral tegmental area are involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neurobiol Learn Mem*, 2007; 88: 352-8.

Aistrup GL, Marszalec W, Narahashi T. Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol*, 1999; 55: 39-49.

Akaike A, Tamura Y, Yokota T, Shimohama S, Kimura J. Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against n-methyl-d-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res*, 1994; 644: 181-7.

Aleman A, Bronk E, Kessels RPC, Koppeschaar HPF, Van Honk J. A single administration of testosterone improves visuospatial ability in young women. *Psychoneuroendocrinology*, 2004; 29: 612-17.

Alford S, Frenguelli BG, Schofield JG, Collingridge GL. Characterization of Ca^{2+} signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synaptic activation of NMDA receptors. *Journal of Physiology*, 1993; 469: 693-716.

Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997; 283: 1396-411.

Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM, Albuquerque EX. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci*, 1999; 19: 2693-705.

Al-Rejaie S, Dar MS. Antagonism of ethanol ataxia by intracerebellar nicotine: possible modulation by mouse cerebellar nitric oxide and cGMP. *Brain Res Bull*, 2006b; 69: 187-96.

Al-Rejaie S, Dar MS. Behavioral interaction between nicotine and ethanol: possible modulation by mouse cerebellar glutamate. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006a; 30: 1223-33.

Altemus KL, Almli CR. Neonatal hippocampal damage in rats: long-term spatial memory deficits and associations with magnitude of hippocampal damage. *Hippocampus*, 1997; 7: 403-15.

- Altman J, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *Jour Comp Neurol*, 1990; 301: 365-81.
- Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 1962; 135: 1127-8.
- Amara SG, Fontana AC. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int*, 2002; 41: 313-8.
- Amaral D, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Anderson P et al., editors. *The hippocampus book*. Oxford University Press; New York: 2007; 37-114.
- American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 1994.
- Andersen P, Sundberg SH, Sween O, Wigström O. Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. *Nature*, 1977; 266: 736-37.
- Andersen SL. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2003; 27: 3-18.
- Anderson CM, Bridges RJ, Chamberlin R, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Swanson RA. Differing effects of substrate and nonsubstrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J Neurochem*, 2001; 79: 1207-16.
- Anderson SA, Classey JD, Conde F, Lund JS, Lewis DA. Synchronous development of pyramidal neuron dendritic spines and parvalbumin-immunoreactive chandelier neuron axon terminals in layer III of monkey prefrontal cortex. *Neuroscience*, 1995; 67: 7-22.
- Aramakis VB, Metherate R. Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex, *J Neurosci*, 1998; 18: 8485-95.
- Araujo DM, Lapchak PA, Collier B, Quirion R. Characterization of N-[3H]methylcarbamylcholine binding sites and effect of N-methylcarbamylcholine on acetylcholine release in rat brain. *J Neurochem*, 1988; 51: 292-9.
- Araújo JB, Gomes WB. Adolescência e as expectativas em relação aos efeitos do álcool. *Psicol Repl Crit*, 1998; 11: 5-33.
- Arnett JJ. Adolescent storm and stress, reconsidered. *The American Psychologist*, 1999; 54: 317-26.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci*, 1997; 94: 4155-60.

Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci*, 1994; 14: 5559-69.

Attaway CM, Compton DM, Turner MD. The effects of nicotine on learning and memory: a neuropsychological assessment in young and senescent Fischer 344 rats. *Physiol Behav*, 1999; 67: 421-31.

Aubert I, Cecyre D, Gauthier S, Quirion R. Comparative ontogenic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J Comp Neurol*, 1996; 369: 31-55.

Baker DA, Xi ZX, Shen H, Swanson CJ, Kalivas PW. The origin and neuronal function of in vivo glutamate. *J Neurosci*, 2002; 22: 9134-41.

Balfour DJ, Benowitz N, Fagerstrom K, Kunze M, Keil U. Diagnosis and treatment of nicotine dependence with emphasis on nicotine replacement therapy. *Europ Heart J*, 2000; 21: 438.

Balfour DJ. The effects of nicotine on brain neurotransmitter systems. *Pharmacol Ther*, 1982; 16: 269-82.

Bammer G, Chesher GB. An analysis of some effects of ethanol on performance in a passive avoidance task. *Psychopharmacology*, 1982; 77: 66-73.

Bancroft A, Levin ED. Ventral hippocampal $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic receptors and chronic nicotine effects on memory. *Neuropharmacology*, 2000; 39: 2770-8.

Bannai S, Christensen HN, Vadgama JV, Ellory JC, Englesberg E, Guidotti GG, et al. Amino acid transport systems. *Nature*, 1984; 311: 308.

Bannai S, Kitamura E. Role of proton dissociation in the transport of cystine and glutamine in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem*, 1981; 256: 5770-2.

Bannai S, Kitamura E. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem*, 1980; 255: 2372-6.

Bannai S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1984; 779: 289-306.

Bao X, Hui D, Naassila M, Michaelis EK. Chronic ethanol exposure increases gene transcription of subunits of an N-methyl-D-aspartate receptor-like complex in cortical neurons in culture. *Neurosci Lett*, 2001; 315: 5-8.

Bardo MT, Dwoskin LP. Biological connection between novelty- and drug-seeking motivational systems. *Nebr Symp Motiv*, 2004; 50: 127-158.

Barrantes GE, Murphy CT, Westwick J, Wonnacott S. Nicotine increases intracellular calcium in rat hippocampal neurons via voltage-gated calcium channels. *Neurosci Lett*, 1995; 196: 101-104.

- Barrantes GE, Westwick J, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors in primary cultures of hippocampal neurons: pharmacology and Ca^{++} permeability. *Biochem Soc Trans*, 1994; 22: 294S.
- Barron S, White A, Swartzwelder HS, Bell RL, Rodd ZA, Slawecki CJ, et al. Adolescent vulnerabilities to chronic alcohol or nicotine exposure: Findings from rodent models. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005; 29: 1720-5.
- Batel P, Pessione F, Maître C, Rueff B. Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction*, 1995; 90: 977-80.
- Batra A. Tobacco use and smoking cessation in the psychiatric patient. *Fortschritte de Neurologie-Psychiatries*, 2000; 68: 80-92.
- Bau CHD. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2002; 7: 183-90.
- Baudry M, Massicotte G. Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and memory. *Concepts in Neuroscience*, 1992; 3: 79-98.
- Baumrind D. A developmental perspective on adolescent risk taking in contemporary America. *New Dir Child Dev*, 1987; 37: 93-125.
- Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, 1982; 216: 890-2.
- Bayer SA. [3H]Thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res*, 1983; 50: 329-40.
- Becker HC, Veatch LM, Diaz-Granados JL. Repeated ethanol withdrawal experience selectively alters sensitivity to different chemoconvulsant drugs in mice. *Psychopharmacology*, 1998; 139: 145-53.
- Bellinger FP, Davidson MS, Bedi KS, Wilce PA. Neonatal ethanol exposure reduces AMPA but not NMDA receptor levels in the rat neocortex. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002; 30: 77-84.
- Bellinger L, Cepeda-Benito A, Bullard RL, Wellman PJ. Effect of i.c.v. infusion of the alpha-MSH agonist MTII on meal patterns in male rats following nicotine withdrawal. *Life Sci*, 2003; 73: 1861-72.
- Belluzzi JD, Lee AG, Oliff HS, Leslie FM. Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology*, 2004; 174: 389-95.
- Benes FM. Myelination of cortical-hippocampal relays during late adolescence. *Schizophrenia Bulletin*, 1989; 15: 585-93.
- Benito E, Barco A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci*, 2010; 33: 230-40.

Benjamin AM, Quastel JH. Cerebral uptakes and exchange diffusion in vitro of L-and D-glutamates. *J Neurochem*, 1976; 26: 431-41.

Benowitz NL, Porchet H, Sheiner L, Jacob P III. Nicotine absorption and cardiovascular effects with smokeless tobacco use: Comparison with cigarettes and nicotine gum. *Clin Pharmacol Ther*, 1988; 44: 23-8.

Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, 2000; 25, 515-32.

Best B. *The Anatomical Basis of Mind*. Chapter 3 – Learning, Memory and Plasticity, 1990. Acessado em Março, 2011. Disponível em:
<<http://www.benbest.com/science/anatmind/anatmd3.html>>

Bien TH, Burge R. Smoking and drinking: a review of the literature. *International Journal of Addiction*, 1990; 25: 1429-54.

Binnie V, McHugh S, Macpherson L, Borland B, Moir K, Malik K. The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine. *Oral Diseases*, 2004; 10: 287-93.

Bishop C, Parker GC, Coscina DV. Systemic nicotine alters whole-body fat utilization in female rats. *Physiol Behav*, 2004; 80: 563-7.

Blackford AL, Yang G, Hernandez-Avila M, Przewozniak K, Zatonski W, Figueiredo V, et al. Cotinine Concentration in Smokers from Different Countries: Relationship with Amount Smoked and Cigarette Type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006; 15: 1799-804.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993; 361: 31-9.

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 1973; 232: 331-56.

Bloomfield K, Stockwell T, Gmel G, Rehn N. International Comparisons of Alcohol Consumption. *Alcohol Research & Health*, 2003; 27: 95-109.

Blum K, Braverman ER, Holder JM, Lubar JF, Monastra VJ, Lubar JO, et al. Reward deficiency syndrome: a biogenetic model for the diagnosis and treatment of impulsive, addictive, and compulsive behaviors. *J Psychoactive Drugs*, 2000; 32: 1-112.

Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, et al. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA*, 1990; 263: 2055-60.

Bobo JK, Husten C. Sociocultural Influences on Smoking and Drinking. *Alcohol Research & Health*, 2000; 24: 225-32.

Booker TK, Collins AC. Long-term ethanol treatment elicits changes in nicotinic receptor binding in only a few brain regions. *Alcohol*, 1997; 14: 131-40.

Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Collingridge GL. Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol*, 1999; 9: 299-304.

Bortoluzzi DA, Viana SB, Fiuza SF. O atendimento humanizado ao adolescente usuário de substâncias psicoativas numa perspectiva interdisciplinar. *Adolescência e Saúde*, 2008; 2: 36-41.

Bourgeois JP, Goldman-Rakic PS, Rakic P. Synaptogenesis in the prefrontal cortex of rhesus monkeys. *Cereb Cortex*, 1994; 4: 78-96.

Bourguignon J-P, Lebrethon MC, Gérard A, Purnell G, Vandersmissen E, Parent AS, et al. Amino acid neurotransmission and early ontogeny of pulsatile GnRH secretion from the rat hypothalamus. In: Bourguignon J-P, Plant TM, eds. *The onset of puberty in perspective*. Science BV, 2000; 119-129.

Bourne HR. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 1997; 9: 134-42.

Bowery NG, Hill DR, Hudson AL, Doble A, Middlemiss DN, Shaw J, et al. Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, 1980; 283: 92-4.

Boyce-Rustay JM, Holmes A. Ethanol-related behaviors in mice lacking the NMDA receptor NR2A subunit. *Psychopharmacology*, 2006; 187: 455-66.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-54.

Braitenberg V, Schüz A. *Cortex: Statistics and geometry of neuronal connectivity*, 2. Ed., Springer, 1998.

Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci*, 1989; 48: 29-69.

Brasnjo G, Otis TS. Neuronal glutamate transporters control activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors and influence cerebellar long-term depression. *Neuron*, 2001; 31: 607-16.

Brioni JD, Decker MW, Sullivan JP, Arneric SP. The pharmacology of (-)-nicotine and novel cholinergic channel modulators. *Adv Pharmacol*, 1997; 37: 153-214.

Broide RS, Leslie FM. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol*, 1999; 20: 1-16.

Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*, 2009; 10: 519-29.

Brown KL, Pagani JH, Stanton ME. Spatial conditional discrimination learning in developing rats. *Dev Psychobiol*, 2005; 46: 97-110.

Buisson B, Bertrand D. Chronic exposure to nicotine upregulates the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor function. *The Journal of Neuroscience*, 2001; 21: 1819-29.

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

Bunch L, Erichsen MN, Jensen AA. Excitatory amino acid transporters as potential drug targets. *Expert Opin Ther Targets*, 2009; 13: 719-31.

Burgos MGPA, Medeiros MC, Bion FM, Pessoa DCNP. Efeitos de bebidas alcóolicas em mães lactantes e suas repercussões na prole. *Rev Bras Saúde Matern Infant*, 2002; 2: 129-35.

Burn JH, Truelove LH, Burn I. The antidiuretic action of nicotine and of smoking. *British Medical Journal*, 1945; 24: 403-6.

Burwell RD, Saddoris MP, Bucci DJ, Wiig KA. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J Neurosci*, 2004; 24: 3826-36.

Cain DP, Boon F, Corcoran ME. Thalamic and hippocampal mechanisms in spatial navigation: A dissociation between brain mechanisms for learning how versus learning where to navigate. *Behav Brain Res*, 2006; 170: 241-56.

Cain DP, Finlayson C, Boon F, Beiko J. Ethanol impairs behavioral strategy use in naive rats but does not prevent spatial learning in the water maze in pretrained rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 2002; 164: 1-9.

Cao J, Belluzzi JD, Loughlin SE, Keyler DE, Pentel PR, Leslie FM. Acetaldehyde, a major constituent of tobacco smoke, enhances behavioral, endocrine, and neuronal responses to nicotine in adolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology*, 2007; 32: 2025-35.

Cardoso RA, Brozowski SJ, Chavez-Noriega LE, Harpold M, Valenzuela CF, Harris RA. Effects of ethanol on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999; 289: 774-80.

Carey RJ, Dai H, Gui J. Effects of dizocilpine (MK-801) on motor activity and memory. *Psychopharmacology*, 1998; 137: 241-6.

Carlini EA, Galduróz JCF, Noto AR, Nappo AS. II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil. CEBRID, UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2002.

Carmody TP, Brischetto CS, Matarazzo JD, O'Donnell RP, Connor WE. Co-occurent use of cigarettes, alcohol, and coffee in healthy, community-living men and women. *Health Psychol*, 1985; 4: 323-35.

Carobrez AP. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2003; 25: 52-58.

Carpenter JA. Effects of alcohol on some psychological processes. *Q Jl Stud Alcohol*, 1962; 23: 274-314.

Carrara-Nascimento PF, Griffin WC 3rd, Pastrello DM, Olive MF, Camarini R. Changes in extracellular levels of glutamate in the nucleus accumbens after ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent and adult mice. *Alcohol*, 2011; 45: 451-60.

Casado M, Bendahan A, Zafra F, Danbolt NC, Aragón C, Giménez C, et al. Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J Biol Chem*, 1993; 268: 27313-7.

Casey BJ, Giedd JN, Thomas KM. Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. *Biol Psychol*, 2000; 54: 241-57.

Castaneda R, Sussman N, Westreich L, Levy R, O'Malley M. A review of the effects of moderate alcohol intake on the treatment of anxiety and mood disorders. *J Clin Psychiatry*, 1996; 57: 207-12.

Castellano C, Brioni JD, Nagahara AH, McGaug JL. Post-training systemic and intra-amygdala administration of the GABA-B agonist baclofen impair retention. *Behav Neural Biol*, 1989; 52: 170-79.

Celik T, Cakir E, Kayir H, Bilgi C, Uzbay IT. The effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on passive avoidance task and serum cholinesterase level in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005; 29: 505-9.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2007 CDC survey: Youth Risk Behavior Surveillance – United States, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Smoking & Tobacco Use. Bidis and Kreteks. February 2007. Acessado em Setembro, 2009. Disponível em: www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/tobacco_industry/bidis_kreteks/

Chandler LJ, Norwood D, Sutton G. Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol Clin Exp Res*, 1999; 23: 363-70.

Changeux JP, Bertrand D, Corringier PJ, Dehaene S, Edelstein S, Léna C, et al. Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Rev*, 1998; 26: 198-216.

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

Chen K, Kandel DB. The natural history of drug use from adolescence to the mid-thirties in a general population sample. *Am J Public Health*, 1995; 85: 41- 7.

Chen WJ, Harle LK. Interactive effect of alcohol and nicotine on developing cerebellum: an investigation of the temporal pattern of alcohol and nicotine administration. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005; 29: 437-42.

Chiodini FC, Tassonyi E, Hulo S, Bertrand D, Muller D. Modulation of synaptic transmission by nicotine and nicotinic antagonists in hippocampus. *Brain Res Bull*, 1999; 48: 623-38.

Cho Y, Bannai S. Uptake of glutamate and cystine in C-6 glioma cells and cultured astrocytes. *J Neurochem*, 1990; 55: 2091-7.

Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*, 1992; 23: 1261-76.

Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, 1987; 7: 369-79.

Clarke PB, Reuben M. Release of [3H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [3H]-dopamine release. *Br J Pharmacol*, 1996; 117: 595-606.

Cole SO. Effects of benzodiazepines on acquisition and performance: a critical assessment. *Neurosci Biobehav Rev*, 1986; 10: 265-72.

Colino A, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro. *J Neurophysiol*, 1993; 69: 1150-9.

Collins AC, Burch JB, De Fiebre CM, Marks MJ. Tolerance to and cross tolerance between ethanol and nicotine. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988; 29: 365-73.

Collins AC, Wilkins LH, Slobe BS, Cao JZ, Bullock AE. Long-term ethanol and nicotine treatment elicit tolerance to ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1996; 20: 990-9.

Conti F, De Biasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and GABAergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 1998; 8: 108-16.

Cooper AJL, Kristal BS. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Che*, 1997; 378: 793-802.

Copeland J, Gates P, Stevenson D, Dillon P. Young People and Alcohol: Taste perception, attitudes and experiences. National Drug and Alcohol Research Centre, University of New South Wales, Sydney, 2005.

Cox DWG, Headley MH, Watkins JC. Actions of L- and D-homocysteate in rat CNS: A correlation between low-affinity uptake and the time courses of excitation by microelectrophoretically applied L-glutamate analogues. *J Neurochem*, 1977; 29: 579-88.

Crabbe JC, Phillips TJ, Buck KJ, Cunningham CL, Belknap JK. Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. *Trends Neurosci*, 1999; 22: 173-9.

Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, et al. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology*, 1997; 132: 107-24.

Crawley JN. Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse strains. *Trends Neurosci*, 1996; 19: 181-7.

Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2007; 86: 189-99.

Crusio WE. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behav Brain Res*, 2001; 125: 127-32.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 2001; 65: 1-105.

Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2001; 70: 439-46.

Dash PK, Moore AN, Moody MR, Treadwell R, Felix JL, Clifton GL. Post-trauma administration of caffeine plus ethanol reduces contusion volume and improves working memory in rats. *J Neurotrauma*, 2004; 21: 1573-83.

Davis JA, James JR, Siegel SJ, Gould TJ. Withdrawal from chronic nicotine administration impairs contextual fear conditioning in C57BL/6 mice. *J Neurosci*, 2005; 25: 8708-13.

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiat*, 1991; 148: 1474-86.

Dawson DA. Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend*, 2000; 59: 235-49.

De Oliveira RW, Nakamura-Palacios EM. Haloperidol increases the disruptive effect of alcohol on spatial working memory in rats: a dopaminergic modulation in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 2003; 170: 51-61.

Decker MW, Anderson DJ, Brioni JD, Donnelly-Roberts DL, Kang CH, O'Neill AB, et al. Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, 1995; 280: 79-89.

Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, et al. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 2004; 47: 227-41.

Di Franza JR, Guerrera MP. Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol*, 1990; 51: 130-5.

Di Franza JR, Rigotti NA, McNeill AD, Ockene JK, Savageau JA, St Cyr D, et al. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tob Control*, 2000; 9: 313-9.

Diana M, Gessa GL, Rossetti ZL. Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of dopamine mesolimbic system. *Alcohol Alcohol*, 1992; 2: 329-33.

Dickerson D, Pittman B, Ralevski E, Perrino A, Limoncelli D, Edgecombe J, et al. Ethanol-like effects of thiopental and ketamine in healthy humans. *J Psychopharmacol*, 2010; 24: 203-11.

Didone V, Closos C, Tirelli E, Quertemont E. Acetaldehyde and the hypothermic effects of ethanol in mice. *Alcoholism: Clin and Experim Res*, 2009; 33: 2005-14.

Dohrman DP, Reiter CK. Ethanol modulates nicotine-induced upregulation of nAChRs. *Brain Res*, 2003; 975: 90-8.

Domercq M, Matute C. Expression of glutamate transporters in the adult bovine corpus callosum. *Mol. Brain Res*, 1999; 67: 296-302.

Domercq M, Sanchez-Gomez MV, Areso P, Matute C. Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *J Neurosci*, 1999; 11: 2226-36.

Domino EF. Tobacco smoking and nicotine neuropsychopharmacology: some future research directions. *Neuropsychopharm*, 1998; 18: 456-68.

Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2003; 75: 411-8.

Dowd LA, Robinson MB. Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na⁺-dependent L-glutamate transport activity in C6 glioma cells by phorbol ester. *J Neurochem*, 1996; 67: 508-16.

Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, 2000; 62: 649-71.

Du J, Suzuki K, Wei Y, Wang Y, Blumenthal R, Chen Z, et al. The anticonvulsants lamotrigine, riluzole and valproate differentially regulate AMPA receptor membrane localization: relationship to clinical effects in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*, 2007; 8: 1-10.

Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *The Journal of Neuroscience*, 1999; 19: 10193-200.

Dubas, JS. Cognitive abilities and physical maturation. *Encyclopedia of adolescence*, 1991; 1: 133-8.

Dubowski KM. Absorption, distribution and elimination of alcohol: Highway safety aspects. *Journal of Studies on Alcohol*, 1985; 10: 98-108.

Dumas TC, Foster TC. Late developmental changes in the ability of adenosine A1 receptors to regulate synaptic transmission in the hippocampus. *Brain Research Developmental Brain Research*, 1998; 105: 137-9.

Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc*, 1957; 46: 208-9.

Durston S, Hulshoff Pol HE, Casey BJ, Giedd JN, Buitelaar JK, Van Engeland H. Anatomical MRI of the developing human brain: what have we learned? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2001; 40: 1012-20.

- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, et al. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998; 22: 998-1040.
- Edenberg HJ, Kranzler HR. The contribution of genetics to addiction therapy approaches. *Pharmacol Ther*, 2005; 108: 86-93.
- Eichenbaum H, Cohen NJ. From conditioning to conscious recollection. New York: Oxford University Press, 2001.
- Eiler WJ, June HL. Blockade of GABA(A) receptors within the extended amygdala attenuates D(2) regulation of alcohol-motivated behaviors in the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats. *Neuropharmacology*, 2007; 52: 1570-9.
- Eilers H, Schaeffer E, Bickler PE, Forsayeth JR. Functional deactivation of the major neuronal nicotinic receptor caused by nicotine and a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, 1997; 52: 1105-12.
- Elders MJ, Perry CL, Eriksen MP, Giovino GA. The report of the Surgeon General: preventing tobacco use among young people. *Am J Public Health*, 1994; 84: 543-7.
- El-Fakahany EF, Miller ER, Abbassy MA, Eldefrawi AT, Eldefrawi ME. Alcohol modulation of drug binding to the channel sites of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 1983; 224: 289-96.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 1998; 4: 1313-7.
- Ernst M, Heishman SJ, Spurgeon L, London ED. Smoking history and nicotine effects on cognitive performance. *Neuropsychopharmacology*, 2001; 25: 313-9.
- Ernst M, Pine DS, Hardin M. Triadic model of the neurobiology of motivated behavior in adolescence. *Psychol Med*, 2006; 36: 299-312.
- Errington ML, Lynch MA, Bliss TV. Long-term potentiation in the dentate gyrus: induction and increased glutamate release are blocked by D(-) aminophosphonovalerate. *Neuroscience*, 1987; 20: 279-84.
- Estatuto da Criança e do Adolescente – ECA (1990) Lei nº 8.069 de 13/07/1990.
- Everitt BJ, Wolf ME. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci*, 2002; 22: 3312-20.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, 1995; 375: 599-603.
- Falk DE, Yi HY, Hiller-Sturmhöfel S. An epidemiologic analysis of co-occurring alcohol and tobacco use and disorders. *Alcohol Research & Health*, 2006; 29: 162-171.

- Faria RR, Lima Rueda AV, Sayuri C, Soares SL, Malta MB, Carrara-Nascimento PF, et al. Environmental modulation of ethanol-induced locomotor activity: correlation with neuronal activity in distinct brain regions of adolescent and adult Swiss mice. *Brain Res*, 2008; 1239: 127-40.
- Farr SA, Scherrer JF, Banks WA, Flood JF, Morley JE. Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005; 29: 971-82.
- Fedele E, Varnier G, Ansaldo MA, 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*, 1998; 125: 1042-408.
- Feldberg W, Guertzenstein PG, Rocha e Silva M Jr. Vasopressin release by nicotine: The site of action. *Br J Pharmacol*, 1975; 54: 463-74.
- Feldman J. Resistência e susceptibilidade na tuberculose. Curso de tisiologia. Balena, 1961; 93-106.
- Fenster CP, Whitworth TL, Sheffield EB, Quick MW, Lester RA. Upregulation of surface $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *J Neurosci*, 1999; 19: 4804-14.
- Fergusson DM, Horwood LJ. Exposure to interparental violence in childhood and psychosocial adjustment in young adulthood. *Child Abuse Negl*, 1998; 22: 339-57.
- Ferrari AM, Toyoda MSS, Faleiros L, Cerutti SM. Plasticidade neural: relações com o comportamento e abordagens experimentais. *Psicol Teor Pesqui*, 2001; 17: 187-94.
- 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; 473: 202-7.
- Filgueiras CC, Manhães AC. Effects of callosal agenesis on rotational side preference of BALB/cCF mice in the free swimming test. *Behavioural Brain Research*, 2004; 155: 13-25.
- Finch CK, Andrus MR, Curry WA. Nicotine replacement therapy-associated syndrome of inappropriate antidiuretic hormone. *South Med J*, 2004; 97: 322-4.
- Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of $\alpha 4$ and $\alpha 2$ subunits and is upregulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol*, 1992; 41: 31-7.
- Floyd DW, Jung KY, McCool BA. Chronic ethanol ingestion facilitates N-methyl-D-aspartate receptor function and expression in rat lateral/basolateral amygdala neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003; 307: 1020-9.
- Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol treatment differentially regulates NMDA receptor subunit mRNA expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995; 29: 99-106.

Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture. *J Biol Chem*, 1996; 271: 13297-9.

Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*, 1984; 42: 1-11.

Fournier KM, González MI, Robinson MB. Rapid trafficking of the neuronal glutamate transporter, EAAC1: evidence for distinct trafficking pathways differentially regulated by protein kinase C and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, 2004; 279: 34505-13.

Francis DD, Zaharia MD, Shanks N, Anisman H. Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: inter-strain variability. *Physiol. Behav*, 1995; 58: 57-65.

Frantz K, Van Hartesveldt C. Locomotion elicited by MK801 in developing and adult rats: temporal, environmental, and gender effects. *Eur J Pharmacol*, 1999b; 369: 145-57.

Frantz K, Van Hartesveldt C. The locomotor effects of MK801 in the nucleus accumbens of developing and adult rats. *Eur J Pharmacol*, 1999a; 368: 125-35.

Freund G, Anderson KJ. Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996; 20: 1165-72.

Fujii S, Ji Z, Morita N, Sumikawa K. Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP. *Brain Res*, 1999; 846: 137-43.

Furini CRG. Participação da via de sinalização NO/GMPc/PKG na memória de reconhecimento de objetos. Dissertação, 2009; PUC/RS/MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE, 2009.

Gäddnäs H, Pietilä 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: 65-72.

Gaffan, D. What is a memory system? Horel's critique revisited. *Behav Brain Res*, 2001; 127: 5-11.

Galduróz JCF, Noto AR, Fonseca AM, Carlini E. V. Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras. Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas – CEBRID/UNIFESP, 2004.

Galea LAM, Kavaliers M, Ossenkopp K-P. Sexually dimorphic spatial learning in meadow voles *Microtus pennsylvanicus* and deer mice *Peromyscus maniculatus*. *Journal of Experimental Biology*, 1996; 199: 195-200.

Galea LAM, Kavaliers M, Ossenkopp K-R, Innes D, Hargreaves EL. Sexually dimorphic spatial learning varies seasonally in two populations of deer mice. *Brain Research*, 1994; 635: 18-26.

Gao XB, van den Pol AN. GABA, not glutamate, a primary transmitter driving action potentials in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol*, 2001; 85: 425-34.

- Gardoni F, Schrama LH, Kamal A, Gispen WH, Cattabeni F, Di Luca M. Hippocampal synaptic plasticity involves competition between Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2001; 21: 1501-9.
- Gaulin SJ, Fitzgerald RW, Wartell MS. Sex differences in spatial ability and activity in two vole species (*Microtus ochrogaster* and *M. pennsylvanicus*). *J Comp Psychol*, 1990; 104: 88-93.
- Gegelashvili G, Schousboe A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol*, 1997; 52: 6-15.
- Gerdeman GL, Partridge JG, Lupica CR, Lovinger DM. It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 2003; 26: 184-192.
- Geretsegger C, Fartacek R. Infusional high-dose application of the calcium-channel- blocking and antiglutamatergic agent caroverine in the treatment of alcohol withdrawal (DSM-111-R 291.80). *Eur Neuropsychopharmacol*, 1998; 8: 191-4.
- Giedd JN, Snell JW, Lange N, Rajapakse JC, Casey BJ, Kozuch PL, et al. Quantitative magnetic resonance imaging of human brain development: ages 4–18. *Cereb Cortex*, 1996; 6: 551-60.
- Gilbertson RJ, Barron S. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005; 81: 54-64.
- Givens B, Williams JM, Gill TM. Septohippocampal pathway as a site for the memory-impairing effects of ethanol. *Hippocampus*, 2000; 10: 111-21.
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci*, 2004; 101: 8174-9.
- Goldstein D, Haldane D, Mitchell C. Sex differences in visual-spatial ability: the role of performance factors. *Memory and Cognition*, 1990; 18: 546-50.
- Gonzales RA, Hoffman PL. Receptor-gated ion channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends Pharmacol Sci*, 1991; 12: 1-3.
- González MI, Kazanietz MG, Robinson MB. Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes. *Molecular Pharmacology*, 2002; 62: 901-10.
- González MI, Ortega A. Regulation of high-affinity glutamate uptake activity in Bergmann glia cells by glutamate. *Brain Research*, 2000; 866: 73-81.
- González MI, Robinson MB. Protein kinase C–dependent remodeling of glutamate transporter function. *Molecular Interventions*, 2004; 4: 48-58.

Goodman LS, Gilman AG, Rall T, Murad F. Animal models and the cognitive effects of ethanol. The pharmacological basis of therapeutics – 11. ed. McGraw-Hill, 2006.

Gopalakrishnan M, Molinari EJ, Sullivan JP. Regulation of human $\alpha 4 \beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Mol Pharmacol*, 1997; 52: 524-34.

Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 10910-7.

Gould E, Woolf NJ, Butcher LL. Postnatal development of cholinergic neurons in the rat: I. Forebrain. *Brain Res Bull*, 1991; 27: 767-89.

Gould TJ, Collins AC, Wehner JM. Nicotine enhances latente inhibition and ameliorates ethanol-induced deficits in latente inhibition. *Nicotine Tob Res*, 2001; 3: 17-24.

Gould TJ, Lommock JA. Nicotine enhances contextual fear conditioning and ameliorates ethanol-induced deficits in contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*, 2003; 117: 1276-82.

Grant BF. Age at smoking onset and its association with alcohol consumption and DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the national longitudinal alcohol epidemiologic survey. *J Substance Abuse*, 1998a; 10: 59-73.

Grant BF. The impact of a family history of alcoholism on the relationship between age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol dependence: Results of the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *Alcohol Health & Research World*, 1998b; 22: 144-147.

Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science*, 1992; 258: 1903-10.

Gray P, Holmes H, Hudson J, Kerr D, McCormack P, Schousboe J. Breast cancer followup: how much is enough? *N Z Med J*, 1996; 109: 215.

Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*, 2000; 1: 67-73.

Gruart A, Delgado-García JM. Activity-dependent changes of the hippocampal CA3-CA1 synapse during the acquisition of associative learning in conscious mice. *Genes Brain Behav*, 2007; 6: 24-31.

Grumbach MM. Onset of puberty. In: Berenberg SR (ed) *Puberty, Biologic and Social Components*. Stenfert Kroese, Leiden, Germany, 1975; 1-21.

Grunberg NE. Nicotine as a psychoactive drug: appetite regulation. *Psychopharmacol Bull*, 1986; 22: 875-81.

Guilarte T. The N-methyl-D-aspartate receptor: physiology and neurotoxicology in the developing brain. *Handbook of developmental neurotoxicology*. San Diego, CA: Academic Press, 1998; 285-304.

Hagan JJ, Jansen JH, Broekkamp CL. Hemicholinium-3 impairs spatial learning and the deficit is reversed by cholinomimetics. *Psychopharmacology*, 1989; 98: 347-56.

Hajek P, Jackson P, Belcher M. Long-term use of nicotine chewing gum. Occurrence, determinants, and effect on weight gain. *JAMA*, 1988; 260: 1593-6.

Hansson E, Ronnback L. Receptor regulation of the glutamate, GABA and taurine high-affinity uptake into astrocytes in primary culture. *Brain Res*, 1991; 548: 215-21.

Happe HK, Murrin LC. High-affinity choline transport regulation by drug administration during postnatal development. *J Neurochem*, 1992; 58: 2053-9.

Harker KT, Whishaw IQ. Impaired place navigation in place and matching-to-place swimming pool tasks follows both retrosplenial cortex lesions and cingulum bundle lesions in rats. *Hippocampus*, 2004; 14: 224-31.

Harris RA, Trudell JR, Mihic SJ. Ethanol's molecular targets. *Sci Signal*, 2008; 1: re7.

Harvey J, Collingridge GL. Thapsigargin blocks the introduction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters*, 1992; 139: 197-200.

Hassel B, Dingledine R. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects*. 7. Ed, – San Diego: Elsevier, 2006; 267-290.

Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*, 1999; 413: 146-54.

Hawkins JD, Graham JW, Maguin E, Abbott R, Hill KG, Catalano RF. Exploring the effects of age of alcohol initiation and psychosocial risk factors on subsequent alcohol misuse. *Journal of Studies on Alcohol*, 1997; 58: 280-290.

Haxby DG. Treatment of nicotine dependence. *Am Health Syst Pharmacol*, 1995; 52: 265-81.

He J, Crews FT. Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007; 86: 327-33.

Hebb DO. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. New York: John Wiley and Sons, 1949.

Hefco V, Yamada K, Hefco A, Hritcu L, Tiron A, Nabeshima T. The interaction between the cholinergic and dopaminergic system in learning and memory process in rats. *Rom J Physiol*, 2004; 41: 21-30.

Hefner K, Holmes A. An investigation of the behavioral actions of ethanol across adolescence in mice. *Psychopharmacology*, 2006; 191: 311-22.

Heishman SJ, Snyder FR, Henningfield JE. Performance, subjective, and physiological effects of nicotine in non-smokers. *Drug Alcohol Depend*, 1993; 34: 11-8.

Henningfield JE, Keenan RM. Nicotine delivery kinetics and abuse liability. *J Consult Clin Psychol*, 1993; 61: 743-50.

Higley JD, Suomi SJ, Linnoila M. A nonhuman primate model of type II alcoholism? Part 2. Diminished social competence and excessive aggression correlates with low cerebrospinal fluid 5hydroxyindoleacetic acid concentrations. *Alcoholism: Clinical and Experimental Res*, 1996; 20: 643-50.

Hillemacher T, Bayerlein K, Wilhelm J, Frieling H, Thürauf N, Ziegenbein M, et al. Nicotine dependence is associated with compulsive alcohol craving. *Addiction*, 2006; 101: 892-97.

Hirsch JC, Crepel F. Postsynaptic calcium is necessary for the induction of LTP and LTD of monosynaptic EPSPs in prefrontal neurons: An in vitro study in the rat. *Synapse*, 1992; 10: 173-75.

Hitchcott PK, Phillips GD. Double dissociation of the behavioural effects of R(+) 7-OH-DPAT infusions in the central and basolateral amygdala nuclei upon Pavlovian and instrumental conditioned appetitive behaviours. *Psychopharmacology*, 1998; 140: 458-69.

Hodges H, Allen Y, Sinden J, Mitchell SN, Arendt T, Lantos PL, et al. The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich fetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats. *Behav Brain Res*, 1991; 43: 7-28.

Hodges H. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res*, 1996; 3: 167-81.

Hoffman PL, Grant KA, Snell LD, Reinlib L, Iorio K, Tabakoff B. NMDA receptors: role in ethanol withdrawal seizures. *Ann NY Acad Sci*, 1992; 654: 52-60.

Hoffman PL, Snell LD, Bhave SV, Tabakoff B. Ethanol inhibition of nmda receptor function in primary cultures of rat cerebellar granule cells and cerebral cortical cells. *Alcohol Alcohol Suppl*, 1994; 2: 199-204.

Hoffman PL. Glutamate receptors in alcohol withdrawal-induced neurotoxicity. *Metab Brain Dis*, 1995; 10: 73-9.

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

Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 1994; 17: 31-108.

Huang YH, Bergles DE. Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol*, 2004; 14: 346-52.

Huang YY, Li XC, Kandel ER. cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase, 1994; 79: 69-79.

Hukkanen J, Jacob III P, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*, 2005; 57: 79-115, 2005.

Hunt PS, Holloway JL, Scordalakes EM. Social interaction with an intoxicated sibling can result in increased intake of ethanol by periadolescent rats. *Developmental Psychobiology*, 2001; 38: 101-09.

Hunter BE, De Fiebre CM, Papke RL, Kem WR, Meyer EM. A novel nicotinic agonist facilitates induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 1994; 168: 130-34.

Huttenlocher PR. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychology*, 1990; 28: 517-27.

Huttenlocher PR. Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *Am J Ment Defic*, 1984; 88: 488-96.

Huttenlocher PR. Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res*; 1979: 163, 195-205.

Hyman SE, Malenka RC. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci*, 2001; 2: 695-703.

Insel TR, Miller LP, Gelhard RE. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain-I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*, 1990; 35: 31-43.

Instituto Médico Legal de São Paulo (IML – SP), 1999. Arquivo CISA (Centro de Informações Sobre Saúde e Álcool). Acessado em Outubro, 2009. Disponível em:<<http://www.cisa.org.br/categoria.html?FhIdCategoria=b58109a471985691cdb64d146b951d4a>>

Instituto Nacional do Câncer – INCA (2004). Vigescola – Vigilância de tabagismo em escolares. Acessado em Fevereiro, 2010. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br/tabagismo/31maio2004/vigescola.pdf>>

Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, J Bonini, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. *Trends Neurosci*, 2006; 29: 496-505.

Izquierdo I, Da Cuna C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol*, 1992; 58: 16-26.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, 1997; 69: 285-316.

Izquierdo I. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. *Drug Development Research*, 1993; 30: 1-17.

Izquierdo I. *Memória*. 2. Ed., rev. e ampl. – Porto Alegre: Artmed, 2011.

Izquierdo I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *FASEB J*, 1994; 8: 1139-45.

Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci*, 1996; 96: 8733-8

Jacobsen LK, Krystal JH, Mennel WE, Westerveld M, Frost SJ, Pugh KR. Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco smokers. *Biol. Psychiatry*, 2005; 57: 56-66.

Jaffard R, Bontempi B, Menzaghi F. Chapter 17. Theoretical and practical considerations for the evaluation of learning and memory in mice. In: Buccafusco JJ editor, *Methods & new frontiers in neuroscience series*. CRC Press. Boca Raton London New York Washington, D.C., 2001.

Jaffe JH. *Encyclopedia of drugs and alcohol*. Volume 1. Nova York, Simon and Schuster Mac Millan, 1995.

Jain R, Mukherjee K, Balhara YP. The role of NMDA receptor antagonists in nicotine tolerance, sensitization, and physical dependence: a preclinical review. *Yonsei Medical Journal*, 2008; 49: 175-88.

Janhunen S, Ahtee L. Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: implications for drug development. *Neurosci Biobehav Rev*, 2007; 31: 287-314.

Jernigan DH. *Global Status Report: Alcohol and Young People – Age of initiation*. Organização Mundial da Saúde, 2001.

Jerome HJ. The concept of dependence: Historical Reflections. *Alcohol Health and Research World*, 1993; 17: 188-90.

Ji D, Lape R, Dani JA. Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 2001; 31: 131-41.

Jo YH, Talmage DA, Role LW. Nicotinic receptor-mediated effects on appetite and food intake. *J Neurobiol*, 2002; 53: 618-32.

Johnston LD, O'malley PM, Bachman JG. *National Survey Results on Drug Use from the Monitoring the Future Study, 1975-2000*. NIH Publication, 1, Bethesda: Department of Health and Human Services, 2001.

Kalandadze A, Wu Y, Robinson MB. Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277: 45741-50.

Kalluri HS, Mehta AK, Ticku MK. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998; 58: 221-4.

Kalsbeek A, Voorn P, Buijs RM, Pool CW, Uylings HB. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol*, 1988; 269: 58-72.

Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, 1992; 360: 467-71.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science*. 4. Ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

Kaneko A, Maeda T, Kume T, Kochiyama H, Akaike A, Shimohama S, et al. Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via $\alpha 7$ -neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res*, 1997; 765: 135-40.

Kanit L, Taskiran D, Yilmaz OA, Balkan B, Demirgoren S, Furedy JJ, et al. Sexually dimorphic cognitive style in rats emerges after puberty. *Brain Res Bull*, 2000; 52: 243-8.

Kanner BI, Marva E. Efflux of L-glutamate by synaptic plasma membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry*, 1982; 21: 3143-7.

Kant GJ, Wylie RM, Vasilakis AA, Gosh S. Effects of triazolam and diazepam on learning and memory as assessed using a water maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996; 53: 317-22.

Kaplan HI, Sadock BJ, Grebb JAA. *Synopsis of Psychiatry*. 7, 1257, 1994.

Karlsson RM, Tanaka K, Saksida LM, Bussey TJ, Heilig M, Holmes A. Assessment of glutamate transporter GLAST (EAAT1)-deficient mice for phenotypes relevant to the negative and executive/cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharm*, 2009; 34: 1578-89.

Katagiri H, Tanaka K, Manabe T. Requirement of appropriate glutamate concentrations in the synaptic cleft for hippocampal LTP induction. *Eur J Neurosci*, 2001; 14: 547-53.

Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 2002; 22: 635-8.

Kenny PJ, File SE, Neal MJ. Evidence for a complex influence of nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal serotonin release. *J Neurochem*, 2000; 75: 2409-14.

Khanna JM, Kalant H, Shah G, Chau A. Effect of (+)MK-801 and ketamine on rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 1992b; 28: 311-4.

Khanna JM, Kalant H, Weiner J, Chau A, Shah G. Ketamine retards chronic but not acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 1992a; 42: 347-50.

Khanna JM, Shah G, Weiner J, Wu PH, Kalant H. Effect of NMDA receptor antagonists on rapid tolerance to ethanol. *Eur J Pharmacol*, 1993; 230: 23-31.

Khanna JM, Wu PH, Weiner J, Kalant H. NMDA antagonist inhibits rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull*, 1991; 26: 643-5.

Kianmaa K, Tabakoff B. Neurochemical correlates of tolerance and strain differences in the neurochemical effects of ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 1983; 18: 383-8.

Kim JH, Do SH, Kim YL, Zuo Z. Effects of chronic exposure to ethanol on glutamate transporter EAAT3 expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for protein kinase C involvement. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005; 29: 2046-52.

Kim JH, Lim YJ, Ro YJ, Min SW, Kim CS, Do SH, et al. Effects of ethanol on the rat glutamate excitatory amino acid transporter type 3 expressed in *Xenopus* oocytes: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *Alcohol Clin Exp Res*, 2003; 27: 1548-53.

Klein LC, Corwin EJ, Ceballos RM. Leptin, hunger, and body weight: influence of gender, tobacco smoking, and smoking abstinence. *Addict Behav*, 2004; 29: 921-7.

Klemm N, Kuhar J. Post-mortem changes in high affinity choline uptake. *J Neurochem*, 1979; 32: 1487-94.

Knoll B, Nordheim A. Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci*, 2009; 32: 432-42.

Koob GF, Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 2001; 24: 97-129.

Koob GF, Roberts AJ, Schulteis G, Parsons LH, Heyser CJ, Hyytia P, et al. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1998; 22: 3-9.

Koob GF. Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci*, 1992; 28: 171-91.

Koshibu K, Levitt P, Ahrens ET. Sex-specific, postpuberty changes in mouse brain structures revealed by threedimensional magnetic resonance microscopy. *Neuroimage*, 2004; 22: 1636-45.

Kostovic I. Structural and histochemical reorganization of the human prefrontal cortex during perinatal and postnatal life. *Prog Brain Res*, 1990; 85: 223-40.

Kubrusly RCC, De Mello MCF, De Mello FG. Aspartate as a selective NMDA receptor agonist in cultured cells from the avian retina. *Neurochem Int*, 1998; 32: 47-52.

Kugler P, Schmitt A. Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia*, 1999; 27: 129-42.

Kvist SBM, Selander R-K. Open-field thigmotaxis during various phases of the reproductive cycle. *Scandinavian Journal of Psychology*, 1994; 35: 220-9.

- Laake JH, Slyngstad TA, Haug FMS, Ottersen OP. Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *J Neurochem*, 1995; 65: 871-81.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-5.
- Lajtha A. Interrelated mechanisms in reward and learning. *Neurochem Int*, 2008; 52: 73-9.
- Lalonde R, Strazielle C. Brain regions and genes affecting postural control. *Prog Neurobiol*, 2007; 81: 45-60.
- Laranjeira R, Pinsky I, Zaleski M, Caetano R. I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS, 2007. Acessado em Março, 2009. Disponível em: <<http://www.obid.senad.gov.br>>
- Larsson A, Engel JA. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2004; 27: 713-20.
- Lathe R. Hormone and hippocampus. *J Endocrinol*, 2001; 169: 205-31.
- Law-Tho D, Desce JM, Crepel F. Dopamine favors the emergence of long-term depression versus long-term potentiation in slices of rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett*, 1995; 188: 125-8.
- Lê AD, Wang A, Harding S, Juzytsch W, Shaham Y. Nicotine increases alcohol self-administration and reinstates alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology*, 2003; 168: 216-21.
- Lebargy F. Biologia da Nicotina. In Yves Martinet & Abraham Bohadana (Eds.) *Tabagismo – Da prevenção à abstinência*, Lisboa: Climepsi, 2003.
- Lebrun B, Sakaitani M, Shimamoto K, Yasudakamatani Y, Nakajima T. New beta-hydroxyaspartate derivatives are competitive blockers for the bovine glutamate/ aspartate transporter. *J Biol Chem*, 1997; 272: 20336-9.
- Leite JP, Cavalheiro EA. Neurobiologia da esclerose medial temporal. Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos. São Paulo: Lemos Editorial, 1998.
- Leonova J, Thorlin T, Aberg ND, Eriksson PS, Ronnback L, Hansson E. Endothelin-1 decreases glutamate uptake in primary cultured rat astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001; 281: 1495-503.
- Levenson J, Weeber E, Selcher JC, Kategaya LS, Sweatt JD, Eskin A. Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. *Nat Neurosci*, 2001; 5: 155-16.
- Levin ED, Rezvani AH. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol*, 2000; 393: 141-6.

Levin ED, Simon B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*, 1998; 138: 217-30.

Levin ED, Simon BB. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*, 1998; 138: 217-30.

Levin ED, Sledge D, Baruah A, Addy NI. Ventral hippocampal NMDA blockade and nicotinic effects on memory function. *Brain Research Bulletin*, 2003; 61: 489-95.

Levin HS, Culhane K, Harmann J, Evankovich K, Mattson AJ, Harward H, et al. Developmental changes in performance on tests of purported frontal lobe functioning. *Dev Neuropsychol*, 1991; 7: 377-95.

Lewis DA. Development of the prefrontal cortex during adolescence: Insights into vulnerable neural circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1997; 16: 385-98.

Li Q, Wilson WA, Swartzwelder HS. Differential effect of ethanol on NMDA EPSCs in pyramidal cells in the posterior cingulate cortex of juvenile and adult rats. *J Neurophysiol*, 2002; 87: 705-11.

Lieber CS. Alcohol and the liver: Metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med*, 2000; 67: 84-94.

Lieber CS. Hepatic and metabolic effects of alcohol. *Gastroenterology*, 1966; 50: 119-33.

Lipp HP, Wolfer DP. Genetically modified mice and cognition. *Curr Opin Neurobiol*, 1998; 8: 272-80.

Little HJ. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol Research & Health*, 2000; 24: 215-24.

Little PJ, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS. Differential effects of ethanol in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996; 20: 1346-51.

Liu Z, Neff RA, Berg DK. Sequential interplay of nicotinic and GABAergic signaling guides neuronal development. *Science*, 2006; 314: 1610-3.

Lopez MF, White NM, Randall CL. Alcohol tolerance and nicotine cross-tolerance in adolescent mice. *Addict Biol*, 2001; 6: 119-27.

Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science*, 1989; 243: 1721-4.

Lovinger DM, White G, Weight FF. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J Neurosci*, 1990; 10: 1372-9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-75.

Lucas ACS, Parente RCP, Picanço NS, Conceição-Costa KRC, Magalhães IRS, Siqueira JCA. Use of psychoactive drugs by health sciences undergraduate students at the Federal University in Amazonas, Brazil. *Cad Saúde Pública*, 2006; 22: 663-71.

Luhmann HJ, Huston JP, Hasenohrl RU. Contralateral increase in thigmotactic scanning following unilateral barrel-cortex lesion in mice. *Behav Brain Res*, 2005; 157: 39-43.

Luja R, Roberts JD, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P. Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat*, 1997; 13: 219-41.

Luna B, Thulborn KR, Munoz DP, Merriam EP, Garver KE, Minshew NJ, et al. Maturation of widely distributed brain function subserves cognitive development. *NeuroImage*, 2001; 13: 786-93.

Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*, 2004; 84: 87-136.

Machado ABM. *Neuroanatomia Funcional*. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology and therapeutics of mood disorders. *The Neuroscientist*, 2009; 15: 525-39.

Macri S, Adriani W, Chiarotti F, Laviola G. Risk-taking during exploration of a plusmaze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Anim Behav*, 2002; 64: 541-6.

Maes M, Meltzer HY, D'hondt P, Cosyns P, Blockx P. Effects of serotonin precursors on the negative feedback effects of glucocorticoids on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Psychoneuroendocrinology*, 1995; 20: 149-67.

Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation – a decade of progress? *Science*, 1999; 285: 1870-4.

Mallett KA, Lee CM, Neighbors C, Larimer ME, Turrissi R. Do we learn from our mistakes? An examination of the impact of negative alcohol-related consequences on college students' drinking patterns and perceptions. *Journal of Studies on Alcohol*, 2006; 26: 269-76.

Mameli M, Zamudio PA, Carta M, Valenzuela CF. Developmentally regulated actions of alcohol on hippocampal glutamatergic transmission. *The Journal of Neuroscience*, 2005; 25: 8027-36.

Manent JB, Represa A. Neurotransmitters and brain maturation: early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. *The Neuroscientist*, 2007; 13: 268-79.

Manhães AC, Guthierrez MC, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res*, 2008; 21: 216-24.

Mann EO, Greenfield SA. Novel modulatory mechanisms revealed by the sustained application of nicotine in the guinea-pig hippocampus in vitro. *J Physiol*, 2003; 551: 539-50.

Mansvelder HD, McGehee DS. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol*, 2002; 53: 606-17.

Mansvelder HD, McGehee DS. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, 2000; 27: 349-57.

Mansvelder HD, McGehee DS. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, 2000; 27: 349-57.

Maragakis NJ, Rothstein JD. Glutamate transporters: animal models to neurologic diseases. *Neurobiol Dis*, 2004; 15: 461-73.

Maren S, Baudry M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem*, 1995; 63: 1-18.

Marin P, Maus M, Desagher S, Glowinski J, Prkmont J. Nicotine protects cultured striatal neurones against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. *Neuroreport*, 1977; 5: 1977-80.

Marinelli S, Pascucci T, Bernardi G, Puglisi-Allegra S, Mercuri NB. Activation of TRPV1 in the VTA excites dopaminergic neurons and increases chemical- and noxious-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 2005; 30: 864-70.

Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*, 1999; 406: 449-60.

Markham JA, Morris JR, Juraska JM. Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. *Neuroscience*, 2007; 144: 961-68.

Marks MJ, Collins AC. Characterization of nicotine binding in mouse brain and comparison with the binding of alpha-bungarotoxin and quinuclidinyl benzolate. *Mol Pharmacol*, 1982; 22: 554-64.

Markwiese BJ, Acheson SK, Levin ED, Wilson WA, Swartzwelder HS. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998; 22: 416-21.

Martí Barros D, Ramirez MR, Dos Reis EA, Izquierdo I. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience*, 2004; 126: 651-6.

Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci*, 2000; 23: 649-711.

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.

Mathews DA, Nadler JV, Lynch GS, Cotman CW. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. *Dev Biol*, 1974; 36: 130-41.

Matsuyama S, Matsumoto A, Enomoto T, Nishizaki T. Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 2000; 12: 3741-7.

Mayer ML, Westbrook GL. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobio*, 1987; 28: 197-276.

McDonald CG, Dailey VK, Bergstrom HC, Wheeler TL, Eppolito AK, Smith LN, et al. Periadolescent nicotine administration produces enduring changes in dendritic morphology of medium spiny neurons from nucleus accumbens. *Neuroscience Letters*, 2005; 385: 163-7.

McDonald JW, Johnston MV, Young AB. Differential ontogenic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Experimental Neurology*, 1990; 110: 237-47.

McGehee DS, Role LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annual Review Physiology*, 1995; 57: 521-46.

McGrew KS. CHC theory and the human cognitive abilities project: standing on the shoulders of the giants of psychometric intelligence research. *Intelligence*, 2009; 37: 1-10.

McKenna M. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in the brain. *Journal of Neuroscience Research*, 2007; 85: 3347-58.

McKinney RA. Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *Journal Physiology*, 2010; 588: 107-16.

McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Rev*, 1993; 18: 33-49.

McWilliams JR, Lynch G. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science*, 1983; 221: 572-4.

Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, 2000; 130: 1007-15.

Messing RO, Carpenter CL, Diamond I, Greenberg DA. Ethanol regulates calcium channels in clonal neural cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1986; 83: 6213-5.

Mihic SJ, Harris RA. GABA and the GABA_A receptor. *Alcohol Health & Research World*, 1997; 21: 127-31.

Miledi R. Intracellular calcium and desensitization of acetylcholine receptors. *Proc R Soc*, 1980; 209: 447- 52.

Miller NS, Gold MS. Comorbid cigarette and alcohol addiction: epidemiology and treatment. *J Addict Dis*, 1998; 17: 55-66.

Minana MD, Montoliu C, Llansola M, Grisolia S, Felipo V. Nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacology*, 1998; 37: 847-57.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL – Instituto Nacional de Câncer – Programa Nacional de Controle do Tabagismo e Outros Fatores de Risco de Câncer – Modelo Lógico e Avaliação Brasil – Ministério da Saúde / Instituto Nacional de Câncer (INCA): Por Um Mundo Livre de Tabaco – Ação Global para Controle do Tabaco: 1º Tratado Internacional de Saúde Pública, 2003; 3a edição. Acessado em Agosto, 2010. Disponível em: http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=publicacoes&link=programa_nacional_final.pdf

Mishkin M et al., 1984. Neurobiology of Human Learning and Review *TRENDS in Neurosciences*, 26, 65-87, 2003. Memory (McGaugh, J.L., Weinberger, N.M., et al. eds), Guildford.

Mishkin M, Suzuki WA, Gadian DG, Vargha-Khadem F. Hierarchical organization of cognitive memory. *Phil Trans RSoc Lond*, 1997; 352: 1461-7.

Moll H. The treatment of post-encephalic parkinsonism by nicotine. *Brit Med J*, 1926; 1: 1079-81.

Moore MS, Deza J, Luk AY, Tully T, Singh CM, Heberlein U. Ethanol intoxication in *Drosophila*: genetic and pharmacological evidence for regulation by the camp signaling pathway. *Cell Press*, 1998; 93: 997-1007.

Moriyama Y, Maeda M, Futai M. Energy coupling of L-glutamate transport and vacuolar H⁺-ATPase in brain synaptic vesicles. *J Biochem*, 1990; 108: 689-93.

Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 1984; 11: 47-60.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 1986; 319: 774-6.

Morris RG, Moser EI, Riedel G, Martin SJ, Sandin J, Day M, et al. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Biol Sci*, 2003; 358: 773-86.

Morris RG. Long-term potentiation and memory. *Biol Sci*, 2003; 358: 643-47.

Morris RGM, Frey U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Phil Trans RSoc Lond*, 1997; 352: 1489-1503.

Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 1982; 297: 681-3.

- Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 1989; 2: 1547-58.
- Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT. Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB*, 1990; 4: 1624-33.
- Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: A meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Review*, 2003; 41: 268-87.
- Nadler JV, Matthews DA, Cotman CW, Lynch GS. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. II. Quantitative changes in choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Dev Biol*, 1974; 36: 142-54.
- Nagy J, Kolok S, Boros A, Dezso P. Role of altered structure and function of NMDA receptors in development of alcohol dependence. *Curr Neuropharmacol*, 2005; 3: 281-97.
- Nakazawa K, Sun LD, Quirk MC, Rondi-Reig L, Wilson MA, Tonegawa S. Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron*, 2003; 38: 305-15.
- Nascimento CAM, Nogueira CW, Borges VC, Rocha JBT. Changes in [3 H]-glutamate uptake into platelets from patients with bipolar I disorder. *Psychiatry Research*, 2006; 141: 343-7.
- Nascimento R. *Revista Proteção*, 2004; 152: 28.
- National Institute on Alcohol Abuse And Alcoholism (NIAAA). Diagnostic Criteria for Alcohol Abuse and Dependence – Alcohol Alert, 30, 1995.
- National Institute on Drug Abuse. Nicotine addiction, 1998; 7: 98- 4342.
- Navarro HA, Seidler FJ, Eylers JP, Baker FE, Dobbins SS, Lappi SE, et al. Effects of prenatal nicotine exposure on development of central and peripheral cholinergic neurotransmitter systems. Evidence for cholinergic trophic influences in developing brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989; 251: 894-900.
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*, 2002; 3: 748-55, 2002.
- Nelson DE, Giovino GA, Shopland DR, Mowery PD, Mills SL, Eriksen MP. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *Am J Public Health*, 1995; 85: 34-40.
- Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 1997; 278: 58-63.
- Nestler EJ, Barrot M, Dileone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression *Neuron*, 2002; 34: 13-25.

Nestler EJ. Psychogenomics: opportunities for understanding addiction. *J Neurosci*, 2001; 21: 8324-7.

Nieoullon A, Canolle B, Masméjean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S. The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? *J Neurochem*, 2006; 98: 1007-18.

O'Keefe J, Nadel L. *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon, 1978.

Oda JY, Sant'ana DMG, Carvalho J. Plasticidade e regeneração funcional do sistema nervoso: contribuição ao estudo de revisão. *Arq Ciências Saúde*, 2002; 6: 171-6.

O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, 1971; 34: 171-5.

Oliveira-da-Silva A, Manhães AC, Cristina-Rodrigues F, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y. Hippocampal increased cell death and decreased cell density elicited by nicotine and/or ethanol during adolescence are reversed during drug withdrawal. *Neuroscience*, 2010; 167: 163-73.

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; 27: 539-48.

O'loughlin J, Kishchuk N. The hardest thing is the habit: a qualitative investigation of adolescent smokers' experience of nicotine dependence. *Nicotine Tobacco Res*, 2002; 4: 201-9.

Organização Mundial Da Saúde (OMS). *Alcohol*, 2005. Acessado em Outubro, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/facts/alcohol/en/index.html>

Organização Mundial Da Saúde (OMS). *El embarazo y el aborto em La adolescência*. Genebra, Organização Mundial da Saúde, 1975.

Organização Mundial Da Saúde (OMS). *Informe sobre la salud en el mundo. Reducir los riesgos y promover una vida sana*. Genebra, 2002a.

Organização Mundial Da Saúde (OMS). *The Global Youth Tobacco Survey: Results In The Americas*. *Epidemiological Bulletin*, 23, 6-9, 2002c.

Organização Mundial Da Saúde (OMS). *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: diagnostic criteria for research*. Genebra, Organização Mundial da Saúde, 1993.

Organização Mundial Da Saúde (OMS). *World Health Organization – Department of Mental Health and Substance Abuse. Global Status Report on Alcohol*, 1, 88, 2004.

Organização Mundial De Saúde (OMS). *Lexicon of alcohol and drug terms*. 1994.

Organização Panamericana da Saúde. Recomendaciones para La atención integral de salud de los adolescentes com énfasis em salud sexual y reproductiva, 2000.

Oroszi G, Goldman D. Alcoholism: genes and mechanisms. *Pharmacogenomics*, 2004; 5: 1037-48.

Otani S, Blond O, Desce JM, Crepel F. Dopamine facilitates long-term depression of glutamatergic transmission in rat prefrontal cortex. *Neuroscience*, 1998; 85: 669-76.

Otton HJ, Janssen A, O'leary T, Chen PE, Wyllie DJA. Inhibition of rat recombinant GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B NMDA receptors by ethanol at concentrations based on the US/UK drink-drive limit *European Journal of Pharmacology*, 2009; 614: 14-21.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, 1998; 54: 581-618.

Pacheco MA, Pastoor TE, Wecker L. Phosphorylation of the alpha4 subunit of human alpha4beta2 nicotinic receptors: role of cAMP-dependent protein kinase (PKA) and protein kinase C (PKC). *Brain Res Mol*, 2003; 114: 65-72.

Packard MG, Cahill L, McGaugh JL. Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci*, 1994; 91: 8477-81.

Packard MG, Knowlton BJ. Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annu. Rev Neurosci*, 2002; 25: 563-93.

Palombini BC. Tabagismo: educação e descontinuação, in: SILVA LCC; *Conduas em Pneumologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

Papke RL, Sanberg PR, Shytle RD. Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001; 297: 646-56.

Parnell SE, West JR, Chen WJ. Nicotine decreases blood alcohol concentrations in adult rats: a phenomenon potentially related to gastric function. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006; 30: 1408-13.

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

Parsons TD, Larson P, Kratz K, Thiebaut M, Bluestein B, Buckwalter JG, et al. Sex differences in mental rotation and spatial rotation in a virtual environment. *Neuropsychologia*, 2004; 42: 555-62.

Parzynski CS, Jaszyna-Gasior M, Franken FH, Moolchan ET. Measuring nicotine intake among highly-dependent adolescent smokers: comparability of saliva and plasma cotinine concentrations. *Pharmacol Biochem Behav*, 89, 145-9, 2008.

Pascual M, Blanco AM, Cauli O, Minarro J, Guerri C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci*, 2007; 25: 541-50.

Paul IA, Skolnick P. Glutamate and depression. *Ann NY Acad Sci*, 2003; 1003: 250-73.

Pechansky F, Szobot CM, Scivoletto S. Uso de álcool entre adolescentes: conceitos, características epidemiológicas e fatores etiopatogênicos. *Rev Bras Psiquiatr*, 2004; 26: 14-7.

Peng X, Gerzanich V, Anand R, Whiting PJ, Lindstrom J. Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol Pharmacol*, 1994; 46: 523-30.

Perrot-Sinal TS, Heale VR, Ossenkopp KP, Kavaliers M. Sexually dimorphic aspects of spontaneous activity in meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*): effects of exposure to fox odor. *Behav Neurosci*, 1996b; 110: 1126-32.

Perrot-Sinal TS, Kostenuik MA, Ossenkopp K-P, Kavaliers M. Sex Differences in Performance in the Morris Water Maze and the Effects of Initial Nonstationary Hidden Platform Training. *Behavioral Neuroscience*, 1996a; 110: 1309-20.

Perry DC, Xiao Y, Nguyen HN, Musachio JL, Dávila-García MI, Kellar KJ. Measuring nicotinic receptors with characteristics of $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ subtypes in rat tissues by autoradiography. *J Neurochem*, 2002; 82: 468-81.

Petralia RS, Wenthold RJ. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol*, 1992; 318: 329-54.

Pfefferbaum A, Mathalon DH, Sullivan EV, Rawles JM, Zipursky RB, Lim KO. A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood. *Arch Neurol*, 1994; 51: 874-87.

PHILIP MORRIS INTERNATIONAL. Acessado em Novembro, 2009. Disponível em: http://www.philipmorrisinternational.com/BR/pages/por_br/ourbus/history_tobacco.asp

Picciotto MR, Addy NA, Mineur YS, Brunzell DH. It is not either/or: activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Prog Neurobiol*, 2008; 84: 329-42.

Pierce JP, Gilpin E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *Am J Pub Health*, 1996; 86: 253-6.

Pillon SC, O'Brien B, Piedra KAC. The relationship between drugs use and risk behaviours in Brazilian university students. *Rev Latino-Am Enfermagem*, 2005; 13: 1169-76.

Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, 1992; 360: 464-7.

Pinsky I, Pavarino-Filho RV. A apologia do consumo de bebidas alcoólicas e da velocidade no trânsito no Brasil: considerações sobre a propaganda de dois problemas de saúde pública. *Rev Psiquiatr RS*, 2007; 29: 110-8.

Pinto DS, Ribeiro SA. Variables related to smoking initiation among students in public and private high schools in the city of Belém, Brazil. *J Bras Pneumol*, 2007; 33: 558-64.

Plant TM, Barker-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Human Reproduction Update*, 2004; 10: 67-77.

Platt SR. The role of glutamate in central nervous system health and disease – a review. *Vet J* Mar, 2007; 173: 278-86.

Pomerleau OF. Nicotine and the central nervous system: biobehavioral effects of cigarette smoking. *Am J Med*, 1992; 93: 2-7.

Popovic M, Caballero-Bleda M, Puelles L, Guerri C. Multiple binge alcohol consumption during rat adolescence increases anxiety but does not impair retention in the passive avoidance task. *Neurosci Lett*, 2004; 357: 79-82.

Poppe WA, Peeters R, Daenens P, Ide PS, Van Assche FA. Tobacco smoking and the uterine cervix: cotinine in blood, urine and cervical fluid. *Gynecol Obstet Invest*, 1995; 39: 110-4.

Postma A, Meyer G, Tuiten A, Van Honk J, Kessels RPC, Thijssen J. Effects of testosterone administration on selective aspects of object-location memory in healthy young women. *Psychoneuroendocrinology*, 2000; 25: 563-75.

Prendergast MA, Harris BR, Blanchard JA, Mayer S, Gibson DA, Littleton JM. In vitro effects of ethanol withdrawal and spermidine on viability of hippocampus from male and female rat. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000; 24: 1855-61.

Primi R. Inteligência: avanços nos modelos teóricos e nos instrumentos de medida. *Avaliação Psicológica*, 2003; 1: 67-77.

Primus RJ, Kellogg CK. Pubertal-related changes influence the development of environment-related social interaction in the male rat. *Dev Psychobiol*, 1989; 22: 633-43.

Proctor WR, Diao L, Freund RK, Browning MD, Wu PH. Synaptic GABAergic and glutamatergic mechanisms underlying alcohol sensitivity in mouse hippocampal neurons. *J Physiol*, 2006; 575: 145-59.

Proctor WR, Dobelis P, Moritz AT, Wu PH. Chronic nicotine treatment differentially modifies acute nicotine and alcohol actions on GABAA and glutamate receptors in hippocampal brain slices. *British Journal of Pharmacology*, 2011; 162: 1351-63.

Pronko PS, Velichko MG, Moroz AR, Rubanovich NN. Low-molecular-weight metabolites relevant to ethanol metabolism: correlation with alcohol withdrawal severity and utility for identification of alcoholics. *Alcohol Alcohol*, 1997; 32: 761-8.

Prut L, Catherine-Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 2003; 463: 3-33.

Quaglia G. Seminário Internacional do Cone Sul sobre Prevenção ao Uso de Drogas no Trabalho. Porto Alegre, 2004.

Quik M, Bordia T, O'leary K. Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*, 2007; 74: 1224-34.

Quoilin C, Didone V, Tirelli E, Quertemont E. Chronic ethanol exposure during adolescence alters the behavioral responsiveness to ethanol in adult mice. *Behav Brain Res*, 2011; 229: 1-9.

Quoilin C, Didone V, Tirelli E, Quertemont E. Ontogeny of the stimulant and sedative effects of ethanol in male and female Swiss mice: gradual changes from weaning to adulthood. *Psychopharmacology*, 2010; 212: 501-12.

Rajachandran L, Spear N, Spear L. Effects of the combined administration of the 5-HT₃ antagonist MDL 72222 and ethanol on conditioning in the periadolescent rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 1993; 46: 535-42.

Rao TS, Correa LD, Adams P, Santori EM, Sacaan AI. Pharmacological characterization of dopamine, norepinephrine and serotonin release in the rat prefrontal cortex by neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Brain Res*, 2003; 990: 203-8.

Reymann KG, Frey JU. The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late associativity' and implications. *Neuropharmacol*, 2007; 52: 24-40.

Reymann KG, Frey U, Matthies H. A multi-phase model of synaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 neurones: protein kinase C activation and protein synthesis are required for the maintenance of the trace. *Synaptic Plasticity in the Hippocampus*, 1988; 126-129.

Reymann KG. Mechanisms underlying long-term potentiation in the hippocampus: focus on postsynaptic glutamate receptors and protein kinases. *Functional Neurology*, 1993; 8: 7-32.

Rezayof A, Motevasseli T, Rassouli Y, Zarrindast MR. Dorsal hippocampal dopamine receptors are involved in mediating ethanol state-dependent memory. *Life Sci*, 2007; 80: 285-92.

Rezvani AH, Levin ED. Nicotine-alcohol interactions and attentional performance on an operant visual signal detection task in female rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003a; 76: 75-83.

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

Rezvani AH, Levin ED. Nicotinic-glutamatergic interactions and attentional performance on an operant visual signal detection task in female rats. *Eur J Pharmacol*, 2003b; 465: 83-90.

Rhodes MC, Seidler FJ, Qiao D, Tate CA, Cousins MM, Thillai I, et al. Does pharmacotherapy for preterm labor sensitize the developing brain to environmental neurotoxins? Cellular and synaptic effects of sequential exposure to terbutaline and chlorpyrifos in neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003; 195: 203-17.

Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Nicotine and ethanol interact during adolescence: effects on the central cholinergic systems. *Brain Res*, 2008; 1232: 48-60.

Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Medeiros AH, Siqueira NR, Filgueiras CC, Manhães AC, et al. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience*, 2009; 162: 1174-86.

Riedel G, Micheau J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2001; 25: 835-53.

Rosato-Siri M, Antonino-Cattaneo M, Cherubini E. Nicotine-induced enhancement of synaptic plasticity at CA3–CA1 synapses requires GABAergic interneurons in adult anti-NGF mice. *J Physiol*, 2006; 576: 361-77.

ROSEMBERG J, MIRANDA MA, ROSEMBERG AMA. Nicotina - Droga Universal. São Paulo (BR): Instituto Nacional de câncer (INCA); 2004. Acessado em Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/nicotina.pdf>>

Rosenberg DR, Lewis DA. Changes in the dopaminergic innervation of monkey prefrontal cortex during late postnatal development: a tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *Biol Psychiatry*, 1994; 36: 272-7.

Rossetti ZL, Carboni S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur J Pharmacol*, 1995; 283: 177-83.

Rowell TE. Variation in age at puberty in monkeys. *Folia Primatol*, 1977; 27: 284-96.

Royal College of Physicians. Royal College of Physicians of London, 2000.

Royle SJ, Collins FC, Rupniak HT, Barnes JC, Anderson R. Behavioural analysis and susceptibility to CNS injury of four inbred strains of mice. *Brain Res*, 1999; 816: 337-49.

Rubinstein ML, Thompson PJ, Benowitz NL, Shiffman S, Moscicki AB. Cotinine levels in relation to smoking behavior and addiction in young adolescent smokers. *Nicotine Tob Res*, 2007; 9: 129-35.

Rubio M, Villain H, Docagne F, Roussel BD, Ramos JA, Vivien D, et al. Pharmacological activation/inhibition of the cannabinoid system affects alcohol withdrawal-induced neuronal hypersensitivity to excitotoxic insults. *PLoS One*, 2011; 6: 1-8.

Sacaan AI, Menzaghi F, Dunlop JL, Correa LD, Whelan KT, Lloyd GK. Epibatidine: a nicotinic acetylcholine receptor agonist releases monoaminergic neurotransmitters: in vitro and in vivo evidence in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996; 276: 509-15.

Sakic B, Szechtman H, Denburg S, Carbotte R, Denburg JA. Spatial learning during the course of autoimmune disease in MRL mice. *Behavioural Brain Research*, 1993; 54: 57-66.

Samson HH, Harris RA. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci*, 1992; 13: 206-11.

Sandyk R, Gillman MA. Baclofen-induced memory impairment. *Clin Neuropharmacol*, 1985; 8: 294-5.

Sanna E, Serra M, Cossu A, Bolombo G, Follesa P, Cuccheddu T, et al. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABAA and NMDA receptor function in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 1993; 17: 115-23.

Sargent SS, Stafford KR. *Basic Teachings of the Great Psychologists*. Garden City, New York: Dolphin Books, 1965.

Saucier D, Cain DR. Spatial learning without NMDA receptor-dependant long-term potentiation. *Nature*, 1995; 378: 186-8.

Scerri C, Stewart CA, Breen KC, Balfour DJK. The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat. *Psychopharmacology*, 2006; 184: 540-6.

Schelini PW. Teoria das inteligências fluida e cristalizada: início e evolução. *Estudos de Psicologia*, 2006; 11: 323-32.

Schlett K. Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Current Topics Medicinal Chemistry*, 2006; 6: 949-60.

Schmid B, Hohm E, Blomeyer D, Zimmermann US, Schmidt MH, Esser GU, et al. Concurrent alcohol and tobacco use during early adolescence characterizes a group at risk. *Alcohol & Alcoholism*, 2007; 42: 219-25.

Schorling JB, Gutgesell M, Klas P, Smith D, Keller A. Tobacco, alcohol and other drug use among college students. *J Subst Abuse*, 1994; 6: 105-15.

Schousboe A. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int Rev Neurobiol*, 1981; 22: 1-45.

Schummers J, Browning MD. Evidence for a role for GABA(A) and NMDA receptors in ethanol inhibition of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001; 94: 9-14.

Scivoletto S, Malbergier A. *Fundamentos de toxicologia – parte 4: Toxicologia social e medicamentos*. 2 ed-São Paulo: Atheneu, 271-286, 2003.

Scott AM, Kellow JE, Shuter B, Cowan H, Corbett AM, Riley JW, et al. Intragastric distribution and gastric emptying of solids and liquids in functional dyspepsia. Lack of influence of symptom subgroups and H. pylori-associated gastritis. *Dig Dis Sci*, 1993; 38: 2247-54.

Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD). *Cartilha Álcool e Jovens*, 2005. Acessado em Janeiro, 2009. Disponível em: <http://www.senad.gov.br/cartilhas/Alcool%20e%20Jovens.pdf>>

Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD). *VI Semana Nacional Antidrogas*, Brasília, 2004.

Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD). *VI Semana Nacional Antidrogas*, Brasília, 2004.

Sei Y, Arora PK, Skolnick P, Paul IA. Spatial learning impairment in a murine model of AIDS. *FASEB Journal*, 1992; 6: 3008-13.

Sershen H, Balla A, Lajtha A, Vizi ES. Characterization of nicotinic receptors involved in the release of noradrenaline from the hippocampus. *Neuroscience*, 1997; 77: 121-30.

Shankar S, Teyler TJ, Robbins N. Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampal area CA1. *J Neurophysiol*, 1998; 79: 334-41.

Sharifzadeh M, Tavasoli M, Naghdi N, Ghanbari A, Amini M, Roghani A. Post-training intrahippocampal infusion of nicotine prevents spatial memory retention deficits induced by the cyclo-oxygenase-2-specific inhibitor celecoxib in rats. *J Neurochem*, 2005; 95: 1078-90.

Shen H, Sabaliauskas N, Sherpa A, Fenton AA, Stelzer A, Aoki C, et al. A critical role for $\alpha 4\beta 2$ GABA receptors in shaping learning deficits at puberty in mice. *Science*, 2010; 327: 1515-18.

Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, Sakaitani M, Shigeri Y, Yumoto N, et al. DL-threo-beta-benzoyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol*, 1998; 53: 195-201.

Shimamoto K, Shigeri Y, Yasuda-Kamatani Y, Lebrun B, Yumoto N, Nakajima T. Syntheses of optically pure beta-hydroxyaspartate derivatives as glutamate transporter blockers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2000; 10: 2407-10.

Shimohama S, Akaike A, Iomura J. Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. *Ann NY Acad Sci*, 1996; 777: 356-61.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 2001; 410: 372-6.

Silveri MM, Spear LP. Decreased sensitivity to the hypnotic effects of ethanol early in ontogeny. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998; 22: 670-6.

Simon JR, Atweh S, Kuhar MJ. Sodium-dependent high affinity choline uptake: a regulatory step in the synthesis of acetylcholine. *J Neurochem*, 1976; 26: 909-22.

Sircar R, Basak AK, Sircar D. Repeated ethanol exposure affects the acquisition of spatial memory in adolescent female rats. *Behavioural Brain Research*, 2009; 202: 225-31.

Sircar R, Sircar D. Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005; 29: 1402-10.

Sircar R, Sircar D. Repeated ethanol treatment in adolescent rats alters cortical NMDA receptor. *Alcohol*, 2006; 39: 51-8.

Siu EC, Tyndale RF. Characterization and comparison of nicotine and cotinine metabolism in vitro and in vivo in DBA/2 and C57BL/6 mice. *Mol Pharmacol*, 2007; 71: 826-34.

- Slotkin TA, Seidler FJ. Nicotine exposure in adolescence alters the response of serotonin systems to nicotine administered subsequently in adulthood. *Dev Neurosci*, 2009; 31: 58-70.
- Slotkin TA. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol Teratol*, 2002; 24: 369-84.
- Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. 6th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1967.
- Snell LD, Tabakoff B, Hoffman PL. Radioligand binding to the N-methyl-D-aspartate receptor/ionophore complex: alterations by ethanol in vitro and by chronic in vivo ethanol ingestion. *Brain Res*, 1993; 602: 91-8.
- Socci DJ, Sanbergi PR, Arendash GW. Nicotine enhances Morris Water Maze performance of young and aged rats. *Neurobiology of Aging*, 1995; 16: 857-60.
- Soderpalm B, Ericson M, Olausson P, Blomqvist O, Engel JA. Nicotinic mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol. *Behav Brain Res*, 2000; 113: 85-96.
- Sorenson EM, Shiroyama T, Kitai ST. Postsynaptic nicotinic receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta of the rat. *Neuroscience*, 1998; 87: 659-73.
- Souza Cruz. Acessado em Novembro, 2009. Disponível em:
<http://www.souzacruz.com.br/OneWeb/sites/SOU_5RRP92.nsf/vwPagesWebLive/80256DA006376DD80256D87004B6A06?opendocument&DTC=&SID>
- Sowell ER, Delis D, Stiles J, Jernigan TL. Improved memory functioning and frontal lobe maturation between childhood and adolescence: a structural MRI study. *J Int Neuropsychol Soc*, 2001a; 7: 312-22.
- Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, Jernigan TL, Toga AW. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nat Neurosci*, 1999; 2: 859-61.
- Sowell ER, Thompson PM, Tessner KD, Toga AW. Mapping continued brain growth and gray matter density reduction in dorsal frontal cortex: Inverse relationships during postadolescent brain maturation. *J Neurosci*, 2001b; 21: 8819-29.
- Sparks JA, Pauly JR. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57Bl/6 mice. *Psychopharmacology*, 1999; 141: 145-53.
- Spear LP, Brake SC. Periadolescence: Age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol*, 1983; 16: 83-109.
- Spear LP, Shalaby IA, Brick J. Chronic administration of haloperidol during development: behavioral and psychopharmacological effects. *Psychopharmacology*, 1980; 70: 47-58.
- Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav Rev*, 2000; 24: 417-63.

- Spear LP. The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *J Stud Alcohol Suppl*, 2002; 14: 71-81.
- Spinardi JR, Catunda JK, Sant'anna MJC, Passarelli MLB, Coates V. Adolescente com HIV: saber, conhecer e conviver. *Adolescência e Saúde*, 2008; 2: 7-14.
- Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*, 1992; 99: 195-231.
- Stanfield BB, Trice JE. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res*, 1988; 72: 399-406.
- Steele-Russell I, Russell MI, Castiglioni JA, Reuter JA, Van Hof MW. Selective attention and Pavlovian conditioning. *Exp Brain Res*, 2006; 173: 587-602.
- Stevenson RA, Besheer J, Hodge CW. Comparison of ethanol locomotor sensitization in adolescent and adult DBA/2J mice. *Psychopharmacology*, 2008; 197: 361-70.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci*, 1992; 89: 10955-9.
- Strack S, Choi S, Lovinger DM, Colbran RJ. Translocation of Autophosphorylated Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II to the Postsynaptic Density. *Journal of Biological Chemistry*, 1997; 272: 13467-70.
- Stratton K, Shetty P, Wallace R, Bondurant S. Clearing the smoke: the science base for tobacco harm reduction--executive summary. *Tob Control*, 2001; 10: 189-95.
- Stumpf H. Performance factors and gender-related differences in spatial ability: another assessment. *Mem Cognit*, 1993; 21: 828-36.
- Sun X, Liu Y, Hu G, Wang H. Activities of cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C are modulated by desensitized nicotinic receptors in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 2004; 367: 19-22.
- Swann JW, Pierson MG, Smith KL, Lee CL. Developmental neuroplasticity: roles in early life seizures and chronic epilepsy. *Adv Neurol*, 1999; 79: 203-16.
- Swanson CJ, Bures M, Johnson MP, Linden AM, Monn JA, Schoepp DD. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005; 4: 131-45.
- Swartzwelder HS, Tilson HA, McLamb RL, Wilson WA. Baclofen disrupts passive avoidance retention in rats. *Psychopharmacology*, 1987; 92: 398-401.
- Swartzwelder HS, Wilson WA, Tayyeb MI. Age-dependent inhibition of long-term potentiation by ethanol in immature versus mature hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res*, 1995a; 19: 1480-5.

Swartzwelder HS, Wilson WA, Tayyeb MI. Differential sensitivity of NMDA receptor-mediated synaptic potentials to ethanol in immature versus mature hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res*, 1995b; 19: 320-3.

Tabb JS, Kish PE, Vandyke R, Ueda T. Glutamate transport into synaptic vesicles – roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem*, 1992; 267: 15412-8.

Tafian GA, Kasschau R. Practice and alcohol effects on motor skill and attention. *Q Jl Stud Alcohol*, 1965; 26: 393-401.

Taioli E, Wynder EL. Effect of the age at which begins on frequency of smoking in adulthood. *N Eng J Med*, 1991; 325: 968-75.

Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, Attwell D. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol*, 1997; 200: 401-9.

Takamori S. VGLUTs: ‘exciting’ times for glutamatergic research? *Neurosci Res*, 2006; 55: 343-51.

Tammimäki A, Pietilä K, Raattamaa H, Ahtee L. Effect of quinpirole on striatal dopamine release and locomotor activity in nicotine-treated mice. *Eur J Pharmacol*, 2006; 15: 118-25.

Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Develop Brain Res*, 1995; 89: 167-72.

Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2003; 27: 33-44.

Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological Mechanisms of the Onset of Puberty in Primates. *Endocrine Reviews*, 2010; 22: 111-51.

Thiel CM, Muller CP, Huston JP, Schwarting RK. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 1999; 93: 243-51.

Tizabi Y, Al-Namaeh M, Manaye KF, Taylor RE. Protective effects of nicotine on ethanol-induced toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Neurotox Res*, 2003; 5: 315-21.

Tizabi Y, Manaye KF, Smoot DT, Taylor RE. Nicotine inhibits ethanol-induced toxicity in cultured cerebral cortical cells. *Neurotox Res*, 2004; 6: 311-6.

Toide K, Arima T. Effects of cholinergic drugs on extracellular levels of acetylcholine and choline in rat cortex, hippocampus and striatum studied by brain dialysis. *Eur J Pharmacol*, 1989; 173: 133-41.

Tokunaga S, Silvers JM, Matthews DB. Chronic intermittent ethanol exposure during adolescence blocks ethanol-induced inhibition of spontaneously active hippocampal pyramidal neurons. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006; 30: 1-6.

Torabi MR, Bailey WJ, Majd-Jabbari M. Cigarette smoking as a predictor of alcohol and other drug use by children and adolescents: evidence of the 'Gateway Drug Effect'. *J Sch Health*, 1993; 63: 302-6.

Tracy Jr HA, Wayner MJ, Armstrong DL. Nicotine blocks ethanol and diazepam impairment of air righting and ethanol impairment of maze performance. *Alcohol*, 1999; 18: 123-30.

Trauth JA, Seidler FJ, Slotkin TA. Persistent and delayed behavioral changes after nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res*, 2000; 880: 167-72.

Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988; 31: 959-62.

Trujillo KA, Akilb H. Excitatory amino acids aspartate receptors in and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 1995; 38: 139-54.

Tsai GE, Ragan P, Chang R, Chen S, Linnoila VM, Coyle JT. Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal. *Am J Psychiatry*, 1998; 155: 726-32.

Tsukada H, Miyasato K, Nishiyama S, Fukumoto D, Kakiuchi T, Domino EF. Nicotine normalizes increased prefrontal cortical dopamine D1 receptor binding and decreased working memory performance produced by repeated pretreatment with MK-801: a pet study in conscious monkeys. *Neuropsychopharm*, 2005; 30: 2144-53.

Tulving E. *Elements of episodic memory*. Oxford: Clarendon, 1983.

Ueda T. Glutamate transport in the synaptic vesicle. *Excitatory amino acids*. London: Macmillan, 173–195, 1986.

Unger JB, Chen X. The role of social networks and media receptivity in predicting age of smoking initiation: A proportional hazards model of risk and protective factors. *Addictive Behaviors*, 1999; 24: 371-81.

United States Department of Health and Human Services (USDHHS) – National household survey on drug abuse: main findings 1996. Rockville, USDHHS, 1998.

United States Department of Health and Human Services (USDHHS) – The health consequences of smoking. *Nicotine Addiction. A report of the Surgeon General*. Washington, USDHHS, 1988.

United States Department of Health and Human Services (USDHHS) – Substance Abuse & Mental Health Services Administration. *National Survey on Drug Abuse and Health*, USDHHS, 2004.

Vaillant GE. *The natural history of alcoholism revisited*, 1.Ed., São Paulo: ArtesMédicas Sul, 1999.

Van Den Berg CJ, Garfinkel D. A simulation study of brain compartments – metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J*, 1971; 123: 211-8.

Van Eden CG, Uylings HB. Postnatal volumetric development of the prefrontal cortex in the rat. *J Comp Neurol*, 1985; 241: 268-74.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 1999; 2: 266-70.

Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 2002; 415: 1030-4.

Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connely A, Van Paesschen W, Mishkin M. Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science*, 1997; 277: 376-80.

Varlinskaya EI, Spear LP, Spear NE. Acute effects of ethanol on behavior of adolescent rats: role of social context. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001; 25: 377-85.

Varlinskaya EI, Spear LP. Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adult rats: role of familiarity of the test situation. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002; 26: 1502-11.

Vecino E, Hernández M, García M. Cell death in the developing vertebrate retina. *The International Journal of Developmental Biology*, 2004; 48: 965-74.

Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *British Journal of Pharmacology*, 2008; 154: 299-315.

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.

Vine MF, Hulka BS, Margolin BH, Truong YK, Hu PC, Schramm MM, et al. Cotinine concentrations in semen, urine, and blood of smokers and nonsmokers. *Am J Publ Health*, 1993; 83: 1335-8.

Voitenko SV, Bobryshev AY, SKOK VI. Intracellular regulation of neuronal nicotinic cholinoreceptors. *Neurosci Behav Physiol*, 2000; 30: 19-25.

Volkow ND, Li TK. Drugs and alcohol: treating and preventive abuse, addiction and their medical consequences. *Pharmacology and Therapeutics*, 2005; 108: 3-17.

Vorhees CV, Reed TM, Morford LL, Fukumura M, Wood SL, Brown CA. Periadolescent rats (P41-50) exhibit increased susceptibility to D-methamphetamine-induced long-term spatial and sequential learning deficits compared to juvenile (P21-30 or P31-40) or adult rats (P51-60). *Neurotoxicol Teratol*, 2005; 27: 117-34.

Wada K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, 1997; 276: 1699-702.

Wager-Srdar SA, Levine AS, Morley JE, Hoidal JR, Niewoehner DE. Effects of cigarette smoke and nicotine on feeding and energy. *Physiol Behav*, 1984; 32: 389-95.

Wallace JR JM, Bachman JG, O' marlley PM, Schulenberg JE, Cooper SM, Johnston LD. Gender and ethnic differences in smoking, drinking and illicit drug use among American 8th, 10th and 12th grade students, 1976-2000. *Addiction*, 2003; 98: 225-34.

Wallgren H, Barry III H. *Actions of alcohol*. Amsterdam and New York: Elsevier, 1970.

Wang H, Sun X. Desensitized nicotinic receptors in brain. *Brain Research Reviews*, 2005; 48: 420-37.

Wang JQ, Tang Q, Parelkar NK, Liu Z, Samdani S, Choe ES, et al. Glutamate signaling to Ras-MAPK in striatal neurons: mechanisms for inducible gene expression and plasticity. *Mol Neurobiol*, 2004; 29: 1-14

Ward RJ, Lallemand F, De Witte P. Biochemical and neurotransmitter changes implicated in alcohol-induced brain damage in chronic or 'binge drinking' alcohol abuse. *Alcohol Alcohol*, 2009; 44: 128-35

Wenk GL. Assessment of spatial memory using radial arm and Ueda: Cognitive dysfunction and his-Morris water mazes. *Brain Res Protoc*, 1998; 3: 100-6.

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, et al. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2002; 22: 1858-67.

Whishaw IQ, Mittleman G, Bunch ST, Dunnett SB. Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. *Behav Brain Res*, 1987; 24: 125-38.

Whishaw IQ, Tomie J-A. Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water maze. *Physiol Behav*, 1996; 60: 1191-7.

White AM, Ghia AJ, Levin ED, Swartzwelder HS. Binge pattern ethanol exposure in adolescent and adult rats: differential impact on subsequent responsiveness to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000; 24: 1251-6.

White AM, Truesdale MC, Bae JG, Ahmad S, Wilson WA, Best PJ, et al. Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002; 73: 673-7.

Whitehouse PJ, Kalaria RN. Nicotinic receptors and neurodegenerative dementing diseases: basic research and clinical implications. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1995; 9: 3-5.

Wilkie GI, Hutson P, Sullivan JP, Wonnacott S. Pharmacological characterization of a nicotinic autoreceptor in rat hippocampal synaptosomes. *Neurochem Res*, 1996; 21: 1141-8.

Williams CL, Meck WH. The organizational effects of gonadal steroids on sexually dimorphic spatial ability. *Psychoneuroendocrinology*, 1991; 16: 155-76.

Wolfer DP, Lipp HP. Evidence for physiological growth of hippocampal mossy fiber collaterals in the guinea pig during puberty and adulthood. *Hippocampus*, 1995; 5: 329-40.

Wollmuth LP, Kuner T, Seeburg PH, Sakmann B. Differential contribution of the NR1- and NR2- subunits to the selectivity filter of recombinant NMDA receptor channels. *J Physiol*, 1996; 491: 779-97.

Wonnacott S, Kaiser S, Mogg A, Soliakov L, Jones IW. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur J Pharmacol*, 2000; 393: 51-58.

Wonnacott S, Mogg A, Bradley A, Jones IW. Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors: subtypes mediating neurotransmitter release. In: Levin ED (ed.). *Nicotinic Receptors in the Nervous System. Methods and New Frontiers in Neuroscience*. CRC Press: Boca Raton, FL, 29-49, 2002.

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

Xu Z, Seidler FJ, Cousins MM, Slikker W JR, Slotkin TA. Adolescent nicotine administration alters serotonin receptors and cell signaling mediated through adenylyl cyclase. *Brain Res*, 2001; 951: 280-92.

Yamauchi T. Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II — Discovery, Progress in a Quarter of a Century, and Perspective: Implication for Learning and Memory. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2005; 28: 1342-54.

Yamazaki Y, Fujii S, Jia Y, Sumikawa K. Nicotine withdrawal suppresses nicotinic modulation of long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci*, 2006b; 24: 2903-16.

Yamazaki Y, Jia Y, Hamaue N, Sumikawa K. Nicotine-induced switch in the nicotinic cholinergic mechanisms of facilitation of long-term potentiation. *Eur J Neurosci*, 2005; 22: 845-60.

Yamazaki Y, Jia Y, Niu R, Sumikawa K. Nicotine exposure in vivo induces long-lasting enhancement of NMDA receptor-mediated currents in the hippocampus. *Eur J Neurosci*, 2006a; 23: 1819-28.

Yildirim M, Mapp OM, Janssen WGM, Yin WL, Morrison JH, Gore AC. Postpubertal decrease in hippocampal dendritic spines of female rats. *Exp Neurol*, 2008; 210: 339-48.

Yin R, French ED. A comparison of the effects of nicotine on dopamine and non-dopamine neurons in the rat ventral tegmental area: an in vitro electrophysiological study. *Brain Res Bull*, 2000; 51: 507-14.

Yogeeswari P, Ragavendran JV, Sriram D. An update on GABA analogs for CNS drug discovery. *Recent Patents CNS Drug Discov*, 2006; 1: 113-8.

Zahalka E, Seidler FJ, Lappi SE, Yanai J, Slotkin TA. Differential development of cholinergic nerve terminal markers in rat brain regions: Implications for nerve terminal density, impulse activity and specific gene expression. *Brain Res*, 1993; 601: 221-9.

Zaleski M, Morato GS, Da-Silva VA, Lemos T. Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da Síndrome de Abstinência do Álcool. *Rev Bras Psiquiatr*, 2004; 26: 40-2.

Zecevic N, Bourgeois JP, Rakic P. Changes in synaptic density in motor cortex of rhesus monkey during fetal and postnatal life. *Brain Res Dev*, 1989; 50: 11-32.

Zevin S, Jacob III P, Geppetti P, Benowitz NL. *Drug and Alcohol Dependence*, 2000; 60: 13-8.

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

Zhou FM, Liang Y, Dani JA. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci*, 2001; 4: 1224-9.

Zink M, Ferbert T, Frank ST, Seufert P, Gebicke-Haerter PJ, Spanagel R. Perinatal exposure to alcohol disturbs spatial learning and glutamate transmission-related gene expression in the adult hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 2011; 34: 457-68.

Zinn CG. A via de sinalização NO/GMPc/PKG na amígdala basolateral desempenha um papel fundamental na consolidação de memórias aversivas em ratos. Porto Alegre: PUCRS, 2009.