



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

André Luiz Nunes Freitas

**A susceptibilidade à nicotina e etanol é afetada pela exposição à nicotina,
fumaça de cigarro e etanol durante o período gestacional: alterações
comportamentais e eletrofisiológicas no período pós-natal de camundongos**

Rio de Janeiro

2014

André Luiz Nunes Freitas

A susceptibilidade à nicotina e etanol é afetada pela exposição à nicotina, fumaça de cigarro e etanol durante o período gestacional: alterações comportamentais e eletrofisiológicas no período pós-natal 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.

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

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho

Rio de Janeiro

2014

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

F586 Freitas, André Luiz Nunes.

A susceptibilidade à nicotina e etanol é afetada pela exposição à nicotina, fumaça de cigarro e etanol durante o período gestacional: alterações comportamentais e eletrofisiológicas no período pós-natal de camundongos / André Luiz Nunes Freitas. – 2014.
138 f.

Orientadora: Yael de Abreu Villaça.

Coorientador: Anderson Ribeiro Carvalho.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Adolescência - Álcool - Teses. 2. Comportamento do adolescente - Efeitos de drogas. 3. Transtorno por Uso de Tabaco - Fisiopatologia. 4. Transtornos relacionados ao uso de substâncias. 5. Manifestações neurocomportamentais - Teses. 6. Exposição materna - Efeitos adversos. I. Villaça, Yael de Abreu. II. Carvalho, Anderson Ribeiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-053.7

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

Assinatura

Data

André Luiz Nunes Freitas

A susceptibilidade à nicotina e etanol é afetada pela exposição à nicotina, fumaça de cigarro e etanol durante o período gestacional: alterações comportamentais e eletrofisiológicas no período pós-natal 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 13 de novembro de 2014.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Pablo Pandolfo
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Alfred Sholl de Franco
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Bruna Romana de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Thomas Eichenberg Krahe
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dra. Yael de Abreu Villaça (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

A minha família. Ao meu Pai, Nelson, que de sua forma e maneira muito me ensinou e ainda tem a me ensinar. A minha Mãe, Walda, que sempre esteve ao meu lado incentivando e torcendo. A minha irmã, Gisele, que sempre fez parte da minha vida da melhor maneira. A minha fiel companheira Ana Carolina (Povis), que não somente me suporta, mas sua ajuda foi fundamental para este trabalho. E principalmente a minha avó, Severina, que, para minha tristeza, não pode estar aqui presente, mas estará sempre sorrindo para mim em meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus professores-orientadores. Pessoas ao qual desejo me espelhar profissionalmente. Na objetividade e qualidade de trabalho da Professora Yael Abreu Villaça, na objetividade e qualidade dos ensinamentos do Professor Alex Christian Manhães e nas conversas enriquecedoras com o Professor Cláudio Carneiro Filgueiras. Agradeço aqui não somente os ensinamentos passados em sala de aula ou nas bancadas, mas também aqueles foram transmitidos na “salinha” (nossa copa, cozinha, sala de estudo, mesa de bar, o que quer que seja isso aqui).

A toda a equipe do laboratório de Neurofisiologia pelo apoio e amizade: é gente pacas, sintam-se todos citados e nomeados aqui!!!

Principalmente aquela ao qual eu tenho o prazer de trabalhar e conviver de maneira direta. Somente tenho a agradecer pelos fins de semana, feriados, madrugadas, dias de sol, noites intermináveis, cálculos infundáveis, homogeneizações, papos loucos, tempo, sangue, suor e lágrimas que foram despendidos da parte de vocês para a confecção destas páginas.

Anderson Ribeiro Carvalho

Pedro Henrique Leal da Rocha

Ana Carolina Dutra Tavares

A minha turma de graduação (BIO 2003/2), que fizeram com que cada minuto passado dentro da UERJ fosse um minuto de alegria, e conhecimento também. Aos grandes amigos do JT (Edifício Jardim Tijuca) que compartilham comigo alegrias desde os meus 9 anos de idade.

Agradeço a equipe do laboratório da professora Kristi A. Kolmeier, da Universidade de Copenhagen, que me recebeu, me orientou, me ensinou e me guiou na busca ne novos conhecimentos.

Já agora, uma vez que ainda tenho mais 5 minutos, agradeço: é claro, a todos os meu professores da graduação, e funcionários também, obrigado por tudo. A NIKE – Fórum Coimbra que patrocinou (com ajuda do meu trabalho de 9h diárias, 6 dias por semana fora os horários extra) meu intercâmbio em Portugal. Ao Colégio Pedro II – Unidade Tijuca, que me deu base (e também amigos) para chegar ate aqui. E Ao Exercito Brasileiro que me ensinou que “assim como a felicidade é passageira, nenhum sofrimento é eterno”.

Enfrentamos dois fatos: o fumo do cigarro contém substância farmacologicamente ativa. A nicotina é um agente farmacológico potente. Todos os toxicólogos, fisiologistas, médicos e a maioria dos químicos, os sabem. Não é nenhum segredo.

Phillip Morris, 1982

RESUMO

NUNES-FREITAS, André Luiz. *A susceptibilidade à nicotina e etanol é afetada pela exposição à nicotina, fumaça de cigarro e etanol durante o período gestacional: alterações comportamentais e eletrofisiológicas no período pós-natal de camundongos*. 2014. 138 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Uma questão particularmente relevante é o fato de exposições precoces a drogas de abuso durante o desenvolvimento potencialmente aumentarem a susceptibilidade a estas drogas posteriormente durante o desenvolvimento. No presente estudo utilizando estudos comportamentais e eletrofisiológicos, investigamos efeitos tardios da exposição de camundongos à fumaça de cigarro, à nicotina e ao etanol durante o período que corresponde à gestação em humanos. Para tal, esta tese foi dividida em 2 estudos. No Estudo 1, submetemos camundongos durante o período que corresponde à gestação de humanos à fumaça de cigarro e/ou etanol visando investigar se a estas drogas de abuso, separadamente ou quando combinadas, programam maior susceptibilidade aos efeitos da nicotina durante a adolescência (PN30) ou idade adulta (PN90). Para avaliar a susceptibilidade, utilizamos 3 testes: campo aberto (CA), preferência pela nicotina (PPN) e preferência condicionada por lugar (CPP). No Estudo 2, os animais foram expostos a nicotina durante o período gestacional e, no período que corresponde à infância (PN9 a PN20), fatias de cérebro contendo o núcleo tegumental laterodorsal (LDT) foram expostas a etanol. Este núcleo foi escolhido uma vez que estudos recentes indicam sua participação em mecanismos de toxicodependência. Foram realizados registros eletrofisiológicos de uma única célula. No Estudo 1, identificamos maior sensibilidade para os efeitos da reexposição à nicotina na adolescência quando comparada com a idade adulta. Em animais testados no CA durante a adolescência, a nicotina foi capaz de causar aumento da atividade locomotora nos animais controle, previamente expostos à fumaça de cigarro e ao etanol. Contudo, em animais expostos à fumaça combinada com etanol, não houve aumento da locomoção. Na idade adulta, a nicotina causou um aumento da atividade locomotora no CA somente nos animais expostos à fumaça de cigarro. Quanto ao CPP, a exposição prévia à fumaça de cigarro e ao etanol causaram aumento da resposta condicionada à nicotina em fêmeas adolescentes. Nos animais previamente expostos à combinação entre fumaça de cigarro e etanol, a resposta condicionada à nicotina não atingiu significância estatística. Não houve alterações na idade adulta. A exposição a fumaça de cigarro e/ou etanol não afetou a PPN. No Estudo 2, os dados eletrofisiológicos mostraram que a exposição pré-natal à nicotina foi capaz de alterar as correntes de despolarização basais e o potencial de repouso de células do LDT. A nicotina também foi capaz de alterar as respostas deste núcleo ao etanol reduzindo as correntes de despolarização e aumentando, embora que não de forma significativa, as correntes inibitórias. De acordo com estes dados, injúrias causadas pela exposição à fumaça do cigarro, à nicotina isoladamente, e ao etanol durante o desenvolvimento são capazes de perdurar por um longo tempo na vida do indivíduo, alterando as respostas a comportamentais e celulares a uma exposição tardia à nicotina e ao etanol.

Palavras-chave: Adolescência. Susceptibilidade. Nicotina. Etanol.

ABSTRACT

NUNES-FREITAS, André Luiz. *A susceptibilidade à nicotina e etanol é afetada pela exposição à nicotina, fumaça de cigarro e etanol durante o período gestacional: alterações comportamentais e eletrofisiológicas no período pós-natal de camundongos*. 2014. 138 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Particularly relevant is the fact that early exposure to drugs of abuse during development potentially increases drug susceptibility later during development. In the present study we used mice models to investigate postnatal behavioral and electrophysiological effects of exposure to cigarette smoke, nicotine and ethanol during the period that corresponds to pregnancy in humans. To this end, this thesis was divided into two studies. In Study 1, we submitted mice to cigarette smoke and / or ethanol in order during the period that corresponds to human pregnancy to investigate whether these drugs of abuse, alone or when combined, programs increased susceptibility to the effects of nicotine during adolescence (PN30) or adulthood (PN90). To evaluate susceptibility, we use three tests: open field (OF), preference for nicotine (PFN) and conditioned place preference (CPP). In Study 2, the animals were exposed to nicotine during pregnancy and, in the period corresponding to childhood (PN9 to PN20), brain slices containing the laterodorsal tegmental nucleus (LDT) were exposed to ethanol. This nucleus was chosen based on recent studies that indicate that it participates in mechanisms of addiction. Whole cell patch clamp recordings were performed. In Study 1, a higher sensitivity to the effects of nicotine exposure was identified during adolescence when compared to adulthood. In animals tested in the OF during adolescence, nicotine was able to cause an increase in locomotor activity in controls, in mice previously exposed to cigarette smoke, and in those exposed to ethanol. However, nicotine failed to increase locomotion in mice previously exposed to smoke combined with ethanol. In adulthood, nicotine caused an increase in OF locomotor activity only in animals exposed to cigarette smoke. In the CPP, previous exposure to cigarette smoke, and to ethanol caused an increase of the conditioned response to nicotine in adolescent females. In animals previously exposed to the combined cigarette smoke and ethanol, the conditioned response to nicotine did not reach statistical significance. There were no changes in adult mice. Exposure to cigarette smoke and / or ethanol did not affect the PFN. In Study 2, electrophysiological data have shown that prenatal exposure to nicotine alters the pattern of basal and depolarization of the resting potential of cells LDT. Nicotine was also able to change the answers this core ethanol reducing and increasing depolarization currents, although not significantly inhibitory currents. According to these data, injuries caused by exposure to cigarette smoke, nicotine alone, and ethanol during development persist during postnatal development, changing the behavioral and cellular responses to a late exposure to nicotine and ethanol.

Keywords: Adolescence. Susceptibility. Nicotine. Ethanol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Máquina de queima de cigarro	50
Figura 2 – Monitor de atividade para o Teste do Campo Aberto (CA)	53
Figura 3 – Gaiola preparada para o Teste de Preferencia Pela Nicotina (PPN).....	54
Figura 4 – Caixa para o Teste da Preferencia Condicionada Por Lugar (CPP).....	55
Figura 5 – Linha temporal do modelo experimental utilizado	57
Figura 6 - Uma cuba de corte de em um vibrátomo Leica (VT1200S)	60
Figura 7 - Micrografia da fatia de cérebro (aumento de 100x0)	62
Figura 8 – Gaiola de Faraday	62
Figura 9 - Massa das progenitoras	66
Figura 10 - Ganho de massa das mães	67
Figura 11 - Ganho de massa dos filhotes	68
Figura 12 - Massa dos filhotes.....	68
Figura 13 - Massa dos filhotes.....	69
Figura 14 - Tempo total de ambulação na adolescência	70
Figura 15 - Tempo total de ambulação na idade adulta	70
Figura 16 - Tempo de permanência do animal no centro da caixa de atividade na adolescência.....	71
Figura 17 - Tempo de permanência do animal no centro da caixa de atividade na idade adulta	72
Figura 18 - Media do consumo de nicotina na adolescência.....	73
Figura 19 - Media do consumo de nicotina na idade adulta	73
Tabela 1 – Porcentagem do tempo gasto na câmara não-preferida	75
Figura 20 - Índice de condicionamento na adolescência	75
Figura 21 - Índice de condicionamento na idade adulta	76
Figura 22 - Eventos Espontâneos	78
Figura 23 - Eventos Excitatórios Espontâneos	79
Figura 24 - Eventos Excitatórios Independentes de Redes de Comunicação Neural	80
Figura 25 - Eventos Inibitórios Espontâneos	82
Figura 26 - Eventos Inibitórios Independentes de Redes de Comunicação Neural.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

i.p.	Intraperitoneal
OMS	Organização Mundial da Saúde
GABAA	Receptores para Ácido Gama-Aminobutírico do tipo A
nAChRs	Receptor nicotínico colinérgico
$\alpha 4\beta 2$	Receptor nicotínico colinérgico do Tipo $\alpha 4\beta 2$
$\alpha 3\beta 4$	Receptor nicotínico colinérgico do Tipo $\alpha 3\beta 4$
$\alpha 7$	Receptor nicotínico colinérgico do Tipo $\alpha 7$
$\beta 2-4$	Subunidades de receptor nicotínico colinérgico
$\alpha 2-8$	Subunidades de receptor nicotínico colinérgico
cm	Centímetros
mg	Miligramas
Kg	quilogramas
mg/Kg	Miligramas por quilo
min	Minutos
ANOVA	Análise de Variância
P	Valor de prova
SNC	Sistema Nervoso Central
NMDA	Receptores para o Glutamato do tipo N-metil-D-aspartato
ACh	Acetilcolina
WHO	World Health Organization
FASD	Fetal Alcohol Spectrum Disorder
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
Nacc	Núcleo Accumbens
FAS	Fetal Alcohol Syndrome (Síndrome Alcoólica Fetal)
ARND	Alcohol Related Neurobehavioral Disorder (Desordem Neurocomportamental Relacionada ao Álcool)
ARBD	Alcohol-Related Birth Defects (Defeitos de Nascimento Relacionados ao Álcool)
FAE	Fetal Alcohol Effects (Efeitos do Álcool no Feto)
NIH	National Institutes of Health

SAMHSA	Substance Abuse and Mental Health Services Administration
PN	Dia de Vida Pós-natal
VTA	Área Tegumental Ventral
PFC	Cortex Pré-Frontal
PPT	Núcleo Tegumental Pedunculopontino
MMWR	Morbidity and Mortality Weekly Report
NIDA	National Institute of Drug Abuse
APC	Consumo de Álcool per Capita
OPS-BM	Organização Panamericana de Saúde – Banco Mundial
MAO	Monoamino Oxidase
QI	Quociente de Inteligência
G	Dia Gestacional
DHHS-US	United States Department of Health and Human Services
DA	Dopaminérgicos
LDT	Núcleo Tegumental Laterodorsal

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS.....	47
2	METODOLOGIA.....	48
2.1	Etapa 1 – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Estudos Comportamentais	48
2.1.1	<u>Exposição à fumaça de cigarro</u>	<u>49</u>
2.1.2	<u>Exposição ao álcool.....</u>	<u>51</u>
2.1.3	<u>Testes comportamentais.....</u>	<u>52</u>
2.1.3.1	Teste do Campo Aberto (CA)	52
2.1.3.2	Teste da Preferência pela Nicotina(PPN)	53
2.1.3.3	Teste da Preferência Condicionada por Lugar (CPP).....	54
2.1.4	<u>Análise dos Dados.....</u>	<u>57</u>
2.2	Etapa 2 – Universidade de Copenhague – Estudos Eletrofisiológicos	57
2.2.1	<u>Exposição dos animais à nicotina.....</u>	<u>57</u>
2.2.2	<u>Preparação do Tecido</u>	<u>59</u>
2.2.3	<u>Registro Eletrofisiológico de uma Única Célula (Whole Cell Patch Clamping).....</u>	<u>60</u>
2.2.4	<u>Análise dos Dados.....</u>	<u>66</u>
3	RESULTADOS.....	66
3.1	Etapa 1 – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Estudos Comportamentais	66
3.1.1	<u>Massa corporal</u>	<u>66</u>
3.1.2	<u>O teste de Campo Aberto (CA).....</u>	<u>69</u>
3.1.3	<u>Teste da Preferência pela Nicotina (PPN)</u>	<u>72</u>
3.1.4	<u>Teste da Preferência Condicionada por Lugar (CPP).....</u>	<u>74</u>
3.2	Etapa 2 – Universidade de Copenhague – Estudos Eletrofisiológicos	76
3.2.1	<u>Etanol e Eventos Espontâneos</u>	<u>76</u>
3.2.2	<u>Etanol e Eventos Excitatórios Espontâneos.....</u>	<u>79</u>
3.2.3	<u>Etanol e Eventos Excitatórios Independentes de Redes de Comunicação Neural</u>	<u>80</u>
3.2.4	<u>Etanol e Eventos Inibitórios Espontâneos e Independentes de Redes de Comunicação Neural</u>	<u>81</u>

4	DISCUSSÃO	85
4.1	Etapa 1_ Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Estudos Comportamentais	85
4.1.1	<u>Modelos de exposição</u>	85
4.1.1.1	Exposição ao álcool.....	85
4.1.1.2	Exposição ao tabaco	87
4.1.2	<u>Massa corporal</u>	90
4.1.2.1	Massa corporal das progenitoras.....	90
4.1.2.2	Massa corporal da prole.....	91
4.1.2	<u>Efeitos da exposição à fumaça de cigarro e\ou etanol durante o desenvolvimento na susceptibilidade a nicotina</u>	92
4.2	Etapa 2 _ Universidade de Copenhagen – Estudos Eletrofisiológicos	96
4.2.1	<u>Efeitos do etanol em eventos espontâneos</u>	97
4.2.2	<u>Etanol e eventos excitatórios</u>	98
4.2.3	<u>Etanol e eventos inibitórios</u>	99
	CONCLUSÕES	102
	Etapa 1 _ Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Estudos Comportamentais	101
	Etapa 2 _ Universidade de Copenhagen – Estudos Eletrofisiológicos	101
	REFERÊNCIAS	103

INTRODUÇÃO

Durante o período de desenvolvimento, o sistema nervoso se mostra mais vulnerável a inúmeros tipos de intervenções. Em um estudo realizado em 2002 nos Estados Unidos, estimou-se que cerca de 12 milhões de crianças apresentam problemas de aprendizado, desenvolvimento do sistema nervoso ou alterações comportamentais, sendo que os custos com tratamentos devidos à exposição a agentes ambientais são superiores a 50 bilhões de dólares (Landrigan et al., 2002).

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

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), há aproximadamente 250 milhões de mulheres tabagistas no mundo. Mais grave ainda, apesar de uma tendência de declínio na proporção de mulheres tabagistas em países desenvolvidos, o número de mulheres tabagistas tem aumentado em países em desenvolvimento como o Brasil (para revisão: Pauly e Slotkin, 2008). Em países desenvolvidos, a prevalência do tabagismo varia de 11 a 35% em mulheres grávidas (MMWR, 2004; Schneider e Schütz, 2008) e estudos recentes mostram que este percentual pode variar de 6 a 32% em cidades brasileiras (Ribeiro et al., 2007). Outras pesquisas suportam que uma a cada seis mulheres fumam em algum momento durante a gravidez (Egebjerg et al., 2008; SAMHSA, 2003), e de 60 a 70% das mulheres grávidas que são tabagistas antes da gravidez não conseguem parar de fumar durante a gravidez (Department of Health, 1998; Mullen, 2004). Cabe notar que estes percentuais podem ser ainda maiores devido ao fato de que grávidas frequentemente não admitem estarem fumando (England et al., 2007).

Em humanos, têm-se demonstrado que a exposição à fumaça do cigarro tem efeitos adversos sobre o desenvolvimento do feto. O tabagismo materno pode levar a déficits que ficam evidentes no início da vida pós-natal, que incluem: asma (Gilliland et al., 2001),

infecções respiratórias (Young et al., 2000), síndrome de abstinência da nicotina, peso reduzido ao nascer e síndrome da morte súbita na infância (Jaddoe et al., 2008; Mitchell et al., 1993), déficits de atenção que podem estar relacionados com defeitos no processamento auditivo, dificuldade com leitura, matemática e habilidades relacionadas (Batstra et al., 2003). Além disto, o tabagismo materno continua a ser um fator de risco durante a infância e a adolescência para problemas cognitivos e neurocomportamentais, como TDAH, transtorno de conduta, desordens de hiperatividade e abuso de substâncias (Thapar et al., 2003; Button et al., 2007).

Ainda de acordo com a OMS, aproximadamente 2 bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas no mundo e 76,3 milhões apresentam algum distúrbio relacionado com o consumo de álcool (The World Health Report, 2004). É particularmente importante considerarmos que esta é uma substância com propriedades psicotrópicas presente nos diversos tipos de bebidas alcoólicas, um potente agente teratogênico com a capacidade de atravessar a placenta livremente (Hannigan e Armant, 2000; Welch-Carre, 2005). Estas características tornam o consumo de álcool por gestantes um grave problema de saúde pública. Estima-se que entre 13 e 20% das mulheres consomem bebidas alcoólicas durante a gestação (Balachova et al., 2011; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009; Senecky et al., 2011).

Uma das consequências do consumo de etanol durante a gravidez é a síndrome alcoólica fetal (*fetal alcohol spectrum disorder* – FASD, sigla em inglês), uma condição cuja taxa de prevalência é duas vezes maior que a das duas alterações congênitas mais comuns (síndrome de Down e espinha bífida) combinadas (May e Gossage, 2001; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007). Dentre as várias alterações associadas ao FASD está o retardo mental, sendo a exposição ao etanol durante a gestação o principal causador desta deficiência cognitiva (Guerri et al., 2009; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007). Outros distúrbios comuns incluem o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Burd et al., 2003) e os déficits de aprendizado e memória (Acheson et al., 2001; Harris et al., 1995). Os efeitos da exposição ao etanol durante o desenvolvimento variam em função do período de exposição, sendo que o terceiro trimestre da gestação de humanos parece ser um período de grande susceptibilidade (Dobbing e Sands 1979; Nunes et al., 2011). Uma observação interessante é que o sistema nervoso do roedor ao nascer é consideravelmente menos maduro que o sistema nervoso humano, assim, os primeiros 10 dias de vida pós-natal do roedor podem ser comparados ao terceiro trimestre da gestação humana (Bayer et al., 1993; Dwyer et al., 2008; Quinn, 2005), um período de intensa sinaptogênese durante o qual o cérebro

humano se desenvolve rapidamente. Desta forma, em roedores, o período que corresponde à gestação de humanos se estende do início da gestação até aproximadamente o 10º dia de vida pós-natal.

Estudos epidemiológicos apontam para uma forte relação entre o fumo e o consumo de etanol, de forma que a co-ocorrência de alcoolismo e tabagismo é muito frequente (Larsson e Engel, 2004), o que sugere que o co- uso e co-abuso de tabaco e etanol ocorram com frequência também durante a gravidez. Em animais experimentais, há muita informação sobre efeitos da exposição pré-natal à nicotina (um dos principais componentes da fumaça de cigarro), mas só recentemente os efeitos da combinação entre a nicotina e o etanol começaram a ser descritos (Abreu-Villaça et al., 2007, 2008; Basta et al., 2000; Matta e Elberger, 2007; McMurray et al., 2008; Oliveira-da-Silva et al., 2009, 2010; Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009).

Cabe ainda mencionar que a nicotina é administrada no organismo juntamente com milhares de substâncias tóxicas que existem no tabaco. Neste já foram isoladas cerca de 6.700, das quais 4.720 bem identificadas quimicamente (Dube e Greem, 1982; Greem e Rodgman, 1996). O tabagista ao inalar a fumaça, com a nicotina da qual está dependente, inala juntamente, em média, 2.500 substâncias potencialmente lesivas ao organismo. Apesar destes dados, há pouca informação sobre os efeitos da fumaça de cigarro e sobre os efeitos da combinação entre esta e o etanol. Assim, nosso grupo de pesquisa iniciou há alguns anos, uma linha de pesquisa destinada a investigar, em modelos animais, os efeitos da exposição à fumaça de cigarros. Identificamos aumento na captação de colina quando a exposição ocorre durante a adolescência (Abreu-Villaça et al., 2010a). Quando a exposição a fumaça ocorre em combinação com o etanol, identificamos efeitos mais fortes do que os efeitos identificados para cada droga em separado. Isto pode ser contatado para níveis de ansiedade vistos em fêmeas e para déficits em memória e aprendizados observados principalmente em machos (Abreu-Villaça et al., 2013a e 2013b).

Como descrito anteriormente, há inúmeras evidências de que as exposições a drogas de abuso durante o desenvolvimento pré-natal causam alterações na prole. Particularmente interessante para este estudo são evidências de aumento da suscetibilidade a drogas de abuso na adolescência e na idade adulta (Cornelius et al., 2000; Abreu-Villaça et al., 2004a, 2004b; Matta e Elberger, 2007; Mamun et al., 2006, Goldschmidt et al., 2011). Estes e outros trabalhos demonstram uma correlação positiva entre tabagismo materno durante a gestação e o desenvolvimento dependência pela nicotina, etanol e outras drogas mais tarde durante o desenvolvimento e na idade adulta.

Dentre estes trabalhos, destaca-se o realizado por Goldschmidte e seus colaboradores onde foi observado que adolescentes expostas ao tabaco durante o primeiro trimestre de gestação foram 1,4 vezes mais propensos do que o grupo de não expostos a experimentar várias outras substâncias, em especial o álcool. Esta exposição previa foi um fator associado à experimentação posterior após o controle de outros fatores como o ambiente familiar e as características demográficas dos grupos avaliados. Além destes trabalhos ainda demonstrarem uma elevada susceptibilidade para a dependência em adolescentes cujas mães fizeram uso de drogas durante a gestação, eles ainda demonstram um dado importante que é a experimentação precoce, principalmente de bebidas alcoólicas, por parte de crianças. Como demonstrado por Cornelius e sua equipe, onde 3% das crianças com 10 anos avaliadas relataram que tinham tido ao menos um episódio de ingestão de bebida alcoólica. Embora baixo, este percentual não deixa de ser alarmante quando consideramos a idade dos avaliados.

Trabalhos feitos em animais têm também encontrado que alterações resultantes da exposição pré-natal podem afetar a susceptibilidade ao uso do tabaco ou etanol mais tarde entre os filhotes expostos. Animais expostos durante toda a gestação à nicotina juntamente com o álcool, adquiriram o comportamento de auto-administração de nicotina quando adolescentes mais rapidamente, e em um percentual e dosagens mais elevadas, que as proles controle ou que receberam somente nicotina ou etanol. (Barbier et al. 2009).

Estudos eletrofisiológicos realizados em células de animais que haviam sido previamente expostos à nicotina durante o desenvolvimento demonstraram alterações tardias para o potencial de membrana em repouso, sugerindo que a exposição pré-natal induz alterações nestas células (Good et al., 2006). Em outro estudo, foram avaliadas as respostas a exposição tardia à nicotina em decorrência da exposição em útero também de nicotina em células de um núcleo relacionado com a dependência, o núcleo tegumentar laterodorsal (LDT), e a exposição pré-natal foi capaz de induzir alterações nas células colinérgicas de LDT que seriam esperados para alterar a excitabilidade celular. Essas alterações podem contribuir para a suscetibilidade tardia à nicotina em indivíduos expostos durante a gestação.

Tendo em vista a importância dos efeitos tardios uso de drogas durante o desenvolvimento gestacional, neste estudo investigamos alterações em parâmetros associados com a susceptibilidade a drogas de abuso em camundongos previamente expostos a nicotina, fumaça de cigarro e etanol durante o período equivalente à gestação de humanos.

Uso e Abuso de Substâncias Psicoativas

Enquanto o álcool, a nicotina e outras drogas aditivas como a heroína e a cocaína são usadas recreativamente, repetitivas exposições a estas substâncias podem alterar a circuitaria neuronal e levar alguns indivíduos a perder o controle do consumo recreativo levando a dependência. Neste estado, o usuário não está mais no controle do uso das substâncias (Koob e Volkow, 2010).

A OMS refere-se ao abuso de drogas, também denominado síndrome de dependência, como o uso nocivo de substâncias psicoativas, incluindo o tabaco, álcool e drogas ilícitas, sendo caracterizado como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após o uso repetido de certas substâncias e que geralmente incluem um forte desejo de uso da droga, dificuldades em controlar o seu uso, persistindo na sua utilização apesar das consequências danosas, uma maior prioridade dada ao uso da droga em detrimento de outras atividades e obrigações e o aumento da tolerância da substância utilizada, o que leva a um aumento do consumo (WHO, 2012). Esta condição é também definida como uma doença cerebral crônica porque tais drogas alteram o cérebro, elas mudam suas estruturas e a maneira como ele funciona (NIDA, 2013).

Hoje em dia, apesar de todos os esforços com políticas de prevenção e intervenções ao nível do sistema de saúde, o uso e abuso de drogas continua a ser um dos maiores e mais importantes problemas de saúde pública no mundo, onde se estima que pelo menos 15,3 milhões de pessoas apresentam alguma desordem devido ao uso de drogas de acordo com a OMS (WHO, 2012). A OMS calcula que o número médio de leitos para o tratamento do alcoolismo e transtornos relacionados ao abuso de drogas no mundo foi de 1,7 por cada 100 000 habitantes em 2008. O menor número médio de leitos notificados foi na Região Africana (0,2 por 100 000 habitantes) e na Região do Mediterrâneo Oriental (0,6 por 100 000 habitantes). O maior número foi relatado a partir de países da Região Europeia (10,3 leitos por 100 000 habitantes) (WHO, 2010).

Os danos causados pelo abuso deste tipo de substâncias vão para além do físico e mental do próprio usuário. É bem conhecido que a dependência é capaz de afetar a saúde de pessoas que estão ao seu redor, seus familiares e a comunidade em que este indivíduo vive. Desta forma o impacto prejudicial do abuso de substâncias psicoativas atinge profundamente a sociedade. A interrupção é a única medida eficaz para prevenir ou limitar os efeitos negativos de longo prazo do uso deste tipo de substância (WHO, 2004; De Biasi e Salas, 2008).

Porém, o poder aditivo deste tipo de substância é tão elevado que interromper o seu uso revela-se um desafio, apesar do reconhecimento de todo potencial prejudicial em curto e longo prazo por parte dos seus usuários (WHO, 2004; Gulliver et al., 2006; De Biasi e Salas, 2008). Um grande obstáculo enfrentado por estes indivíduos para a interrupção definitiva é a presença dos sintomas de abstinência. Na verdade, a duração e a gravidade dos sintomas de abstinência, em alguns casos são tão fortes que este acaba sendo um dos principais fatores de recaída (West et al., 1989; Piasecki et al., 2003). Mesmo para as substâncias psicoativas mais comuns, como no caso do tabaco e do álcool, a interrupção se mostra desafiante. A maioria dos tabagistas e usuários de bebidas alcoólicas reconhecem o impacto negativo do uso de tais substâncias sobre a saúde e prefeririam parar. No entanto, apesar de muitas tentativas, muito poucos realmente obtêm sucesso (Gulliver et al., 2006; De Biasi e Salas, 2008).

O fato é: a dependência da nicotina e do álcool é tão forte que mesmo com a enorme quantidade de conhecimento sobre os efeitos deletérios destas práticas em detrimento a saúde do feto, e da mãe, cessar por completo, uma vez que a cessação é a única medida eficaz para evitar os efeitos negativos, não parece ser possível para um percentual significativo das gestantes.

O Álcool

Presente nos diversos tipos de bebidas alcoólicas, o consumo global de álcool puro em 2010 foi igual a 6,2 litros por pessoa com 15 anos ou acima, o que significa 13,5 gramas da substância pura por dia. Um quarto desse consumo, 24,8%, não tem registro, ou seja, o álcool caseiro, ilegalmente produzido ou vendido fora do controle governamental. Do total registrado de álcool consumido em todo o mundo, 50,1% é consumido na forma de bebidas destiladas. Dados recentes indicam que em todo o mundo 61,7% da população com 15 anos ou mais de idade ingeriram bebidas alcoólicas nos últimos 12 meses. Cerca de 16,0% dos consumidores com nesta idade já tiveram pelo menos um episódio de consumo pesado de bebida alcoólica (WHO, 2014).

Em todas as regiões avaliadas pela OMS, as mulheres são mais frequentemente abstinências do que os homens durante a vida. Devido a diferenças culturais, há uma variação considerável na prevalência de abstenção em todas as regiões observadas. Em geral, quanto maior for a riqueza econômica de um país, o álcool é mais consumido e menor é o número de abstinências. Como regra geral, os países de alta renda têm o maior consumo de álcool per

capita (APC) e a maior prevalência de episódios de consumo pesado entre os bebedores (WHO, 2014).

O uso nocivo do álcool tem um grande impacto na saúde pública. Ele é atualmente classificado como o terceiro principal fator de risco para patologias e incapacidade no mundo. Em 2004, o consumo de álcool foi responsável por cerca de 2,25 milhões de mortes prematuras em todo o mundo e por 4,5% da carga global de doenças (The World Health Report, 2004). Apesar das políticas de prevenção ao consumo excessivo, estes números não diminuem. Em 2012 o consumo de álcool foi responsável por 3,3 milhões de mortes, que corresponde a 5,9% de todas as mortes, ou uma em vinte mortes no mundo (7,6% de homens e 4,0% de mulheres) e a carga global de doenças foi de 5,1%, sendo a maioria, 24,6% devido a desordens neuropsiquiátricas. Quantidades, padrões e contexto social do consumo diferem entre regiões, nações e comunidades em estudos, mas os resultados globais negativos para a saúde são claros (WHO, 2014; Shield et al., 2013).

Uma parcela significativa dos efeitos negativos do uso de álcool é atribuída às injúrias intencionais e não intencionais, incluindo acidentes no trânsito, violência e suicídios. Uma pessoa intoxicada pode prejudicar outras ou colocá-las em risco de acidentes de trânsito ou comportamento violento, ou afetar negativamente colegas de trabalho, parentes e amigos. Assim, o impacto do uso nocivo do álcool atinge profundamente a sociedade. Consumo nocivo é um dos principais determinantes para os transtornos neuropsiquiátricos, tais como transtornos por uso de álcool e epilepsia e outras doenças não transmissíveis, como doenças cardiovasculares, cirrose dos cânceres de fígado e vários outros órgãos (WHO, 2014).

Mecanismos de Atuação do Álcool

O álcool é capaz de interagir bem com a água, apresentando permeabilidade através da membrana plasmática e, portanto, pode se distribuir por todos os compartimentos celulares. Contudo, ele apresenta capacidade de ação limitada apresentando baixa reatividade com a maioria das moléculas e compostos orgânicos presentes nas células (Lovinger e Crabbe, 2005). Além disso, sistemas enzimáticos intracelulares como a álcool desidrogenase, a catalase e o citocromo P450, que o metabolizam, contribuem para reduzir a sua capacidade agir diretamente em alvos intracelulares (Alikunju et al., 2011; Kapoor et al., 2006; Lee et al., 2009).

Inúmeros trabalhos demonstram que o álcool é capaz de interagir e mudar a função de uma série de proteínas de membrana (Dopico e Lovinger, 2009; Harris et al., 2008). Embora

seja capaz de afetar a função de praticamente todos os canais iônicos dependentes de neurotransmissor (Dopico e Lovinger, 2009; Harris et al., 2008), sua ação se concentra principalmente nos receptores para ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABAA) e nos receptores para o glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e tem sido associada a uma série de efeitos no sistema nervoso adulto como, por exemplo, a sedação (Dickerson et al., 2010), a dependência (Wu et al., 2010) e déficits na formação de memórias (Schummers e Browning, 2001). Em linhas gerais, a administração aguda de etanol diminui de modo dose dependente a função dos receptores NMDA e aumenta a função dos receptores GABAA (Proctor et al., 2006).

Esta capacidade do etanol de interferir em canais iônicos dependentes de neurotransmissores tem um destaque especial devido ao fato de ele também influenciar diretamente o funcionamento de receptores nicotínicos do sistema colinérgico (Grant, 1994), os quais são os alvos primários. Desta forma, o sistema colinérgico parece ser um sítio de atuação para estas 2 drogas de abuso.

Nicotina/Tabaco

Os produtos do tabaco são total ou parcialmente feitos da folha do tabaco como matéria prima, que se destinam a ser fumados, sugados, mastigados ou inalados. Todos contêm o ingrediente psicoativo altamente viciante, a nicotina. Considerada um de seus principais componentes ativos, a nicotina tornou-se uma droga universal; utilizá-la é considerado um hábito normal em diversos países, atingindo números impressionantes. Anualmente no mundo, é consumida a enorme quantidade de 73 mil toneladas de nicotina contida em 7 trilhões e 300 bilhões de cigarros fumados por cerca de 1 bilhão e 300 milhões de tabagistas, dos quais 80% vivem nos países em desenvolvimento (OPS-BM, 2000; World Bank, 1999; WHO 2004).

A nicotina é responsável por uma ampla gama de efeitos no sistema nervoso (Benowitz, 1992; Dani e Heinemann, 1996; Slotkin, 2002; Fowler et al., 2008). É um alcaloide vegetal e sua principal fonte de extração para o consumo é através da planta do tabaco.

No Brasil, em 2006, o percentual de fumantes era de 16,2% indo para 15,5% em 2009, segundo dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel; Ministério da Saúde – Brasil, 2009), que entrevistou 54 mil adultos. O índice é um pouco menor que nos Estados Unidos, onde 18,1%

da população adulta fuma (CDC 2014). Ainda de acordo com esta pesquisa 13,3% dos brasileiros não-fumantes moram com pelo menos uma pessoa que costuma fumar dentro de casa. Além disso, 12,8% das pessoas que não fumam convivem com ao menos um colega que fuma no local de trabalho. O fumo passivo é mais comum na residência dos 18 aos 24 anos (19%). Já no ambiente de trabalho, a situação é verificada principalmente na faixa etária dos 25 aos 34 anos (15,8%) e dos 35-44 (15,7%).

O Instituto Nacional do Câncer informa que pelo menos 2,6 mil não fumantes morrem no Brasil por ano devido a doenças provocadas pelo tabagismo passivo. Pessoas que não fumam, mas enfrentam essas condições, têm 30% de chances a mais de desenvolver câncer de pulmão e 24% a mais de sofrer infarto e doenças cardiovasculares (Vigitel; Ministério da Saúde – Brasil, 2009). Ainda de acordo com este levantamento, 19% dos homens e 12,5% das mulheres fumam. A maior queda no uso do cigarro no País ocorreu na faixa etária dos 35 aos 44 anos. Em 2006, 19% da população nessa idade era dependente do tabaco. Em 2009, a proporção de fumantes era de 15,1%.

O tabagismo ainda consta entre as principais causas evitáveis de morbidades e de mortes prematuras no mundo (Ezzati and Lopez, 2003; Jha, 2009; WHO, 2013). A cada ano, a epidemia global tabágica mata cerca de 6 milhões de pessoas, incluindo os mais de 600 mil que morrem devido à exposição passiva ao fumo, estando a caminho de matar mais de 8 milhões até 2030, a esta altura, cerca de 80% das mortes irão ocorrer em países considerados de baixa e média renda (WHO, 2013). Para meados deste século, esta pandemia, conduzida pela dependência à nicotina, será considerada a maior causa de morte, vitimando mais que a tuberculose, AIDS, acidentes de trânsito, homicídios, suicídios, drogas ilegais e alcoolismo, todos somados (OPS-BM, 2000).

Mecanismos de Atuação da Nicotina/Tabaco

Evidências experimentais indicam que as ações da nicotina são responsáveis pelas bases farmacológicas da dependência ao cigarro e outras formas de exposição ao tabaco (US Department of Health and Human Services 1988, Royal College of Physicians 2000). Considerada então como o componente que estabelece e mantém a dependência do indivíduo pelo tabaco (Di Chiara 2000; Stolerman e Shoaib 1991), acredita-se que o tabagismo seja a forma pela qual o indivíduo consegue consumir a nicotina.

A nicotina exerce seus impactos sobre o cérebro interagindo com receptores do sistema colinérgico (nAChRs), que são expressos nas membranas tanto de neurônios pré-

quanto de neurônios pós-sinápticos distribuídos no sistema nervoso (Dani e De Biasi, 2001; Wonnacott et al., 2005). A nicotina afeta, através do sistema colinérgico, diversos outros sistemas de neurotransmissores como o dopaminérgico, o setotoninérgico, noradrenérgico e o sistema GABAérgico (Slotkin e Seidler, 2009; Xiao et al., 2009; Zhao et al., 2007).

Receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) são canais iônicos pentaméricos, constituídos de 5 subunidades transmembrana dispostas ao redor de um poro central, sendo tipicamente encontrados em vertebrados (Dani e Bertrand, 2007). Em mamíferos, já foram clonadas 8 subunidades α ($\alpha 2$ a $\alpha 7$, $\alpha 9$ e $\alpha 10$) e 3 subunidades β ($\beta 2$ a $\beta 4$) (Elgoyhen et al., 1994, 2001; Lindstrom et al., 1996; McGehee e Role, 1995; Sargent, 1993; Tassonyi et al., 2002; Abreu-Villaça et al., 2010a). Tendo em vista a diversidade de subunidades que os compõem, resultando em diferenças na farmacologia e na função, os nAChRs estão divididos em duas classes: heteroméricos ou homoméricos. Os primeiros contem estruturas tipicamente formadas por 2 subunidades α e por 3 subunidades β por pentâmero, enquanto que os segundos são formados unicamente por subunidades α .

No sistema nervoso central, o subtipo mais comumente encontrado é o $\alpha 4\beta 2$, subtipo heteromérico de receptor (Picciotto et al., 1995; Marubio et al., 1999), associando-se a esse subtipo funções cognitivas como aprendizado/memória (Chan et al., 2007). E como subtipo homomérico, o mais encontrado é o $\alpha 7$ (Chen e Patrick, 1997; Orr-Urtreger et al., 1997). No sistema nervoso periférico encontra-se mais facilmente o subtipo $\alpha 3\beta 4$, este medeia sinapses de transmissão rápida nos gânglios autonômicos (Xu et al., 1999). A diversidade dos subtipos de nAChR, sua localização (pré- ou pós-sináptica) e sua distribuição cerebral contribuem para a extensa variedade de mecanismos em que estes receptores participam no sistema nervoso. A ativação dos receptores pré-sinápticos de modo geral promove a liberação de outros neurotransmissores, enquanto que a ativação de receptores pós-sinápticos promove tanto a excitação neuronal como a modulação da atividade enzimática (Aramakis e Metharate, 1998; Dani et al., 2000).

Desta forma, os nAChRs participam em aspectos fundamentais da plasticidade sináptica envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos incluindo o desenvolvimento neuronal, aprendizado e memória, e respostas de reforço induzidas por drogas de abuso (Gopalakrishnan et al., 1997; Jang et al., 2002; Levin e Simon, 1998; Salamone e Zhou, 2000). Há evidências de que os nAChRs também estão envolvidos em processos como ansiedade (File et al., 2000; Ross et al., 2000), controle do sono (Domino e Yamamoto, 1965; Salin-Pascual et al., 1999), antinocicepção (Marubio et al., 1999) e funções do sistema nervoso autônomo (De Biasi, 2002; Xu et al., 1999a, Xu et al., 1999b).

Além de ser alvo de agonistas endógenos, estes receptores também podem ser alvo de fármacos exógenos como a nicotina. Sua atividade e a concentração de agonistas que produzem efeitos são dependentes das subunidades que compõe o receptor. Desta forma, a nicotina pode ativar ou inativar um nAChR, dependendo da dose, da duração da exposição e das propriedades do receptor. O papel destes durante o desenvolvimento pode ser influenciado de forma que irão depender das propriedades farmacológicas e localização dos nAChRs (para revisão: AbreuVillaja et al., 2010a).

Estudos recentes sugerem que, de forma geral, a nicotina promove uma rápida dessensibilização dos nAChRs. A dessensibilização é uma característica de canais do tipo portão dependente de neurotransmissores definida com uma diminuição ou perda de resposta biológica destes em resposta a estimulação prolongada ou repetitiva. Resultante da capacidade da nicotina em estabelecer a conformação inativa dos nAChRs.(Fenster et al., 1997; Pidoplichko et al., 1997; Quick e Lester, 2002; Woollorton et al., 2003; Yu et al., 2009). Assim, os receptores se dessensibilizam ou se inativam pela administração crônica de nicotina, sendo recrutados novos receptores para compensar a referida insensibilização. Estabelece-se nesse intervalo, uma fase de tolerância, que é dose-dependente, sendo esta variável nos indivíduos, influenciando fatores genéticos nessas diferenças (Benowitz, 1998; Clark, 1987; Hirayama, 1984; Houzec e Benowitz, 1999; Nardana et al., 2001; Wonnacott, 1990).

Em suma, a repetição da exposição à nicotina produz uma neuroadaptação (Balfour e Fagerstrom, 1996; Benowitz, 1996). Um estudo realizado em humanos demonstrou este fenômeno em estruturas corticais e subcorticais, onde córtex cerebral, hipocampo e cerebelo apresentaram as maiores alterações (Perry et al., 1999). Desta forma, após a exposição à nicotina, o tempo de curso da dessensibilização será governado pelas taxas de transição entre a conformação inativa e as outras conformações do receptor colinérgico nicotínico.

Após a ligação da nicotina com os nAChRs se estabelece uma fase de insensibilidade, que promoverá, em consequência, um aumento da afinidade por agonistas e/ou aumento da expressão dos nAChRs em comparação com os não-fumantes, nas mesmas idades e do mesmo sexo (Curvall et al., 1990; Rosemberg, 2002. Este efeito é denominado supra-regulação (*upregulation*). Essa supra-regulação está em contraste com os mecanismos envolvendo outros sistemas de neurotransmissores que normalmente apresentam infrarregulação (*downregulation*) quando expostos cronicamente a seus agonistas. Sugere-se amplamente na literatura que esses efeitos promovidos pela nicotina têm papel importante na geração dos seus mecanismos de dependência (Buisson e Bertrand, 2001, 2002; Dani e De Biasi, 2001; Quick e Lester, 2002).

A supra-regulação de nAChRs, é observada em cérebros de fumantes (Wüllner et al., 2008) e animais expostos à nicotina (Abreu-Villaça et al., 2003a). De fato, foi demonstrado que exposições por curtos períodos de tempo (2 dias) e com doses que produzem níveis plasmáticos de nicotina correspondentes a fumar 2 cigarros, já causam supra-regulação de nAChRs em ratos (Abreu-Villaça et al., 2003a). Acredita-se que a supra-regulação constitui uma resposta celular à dessensibilização (Fenster et al., 1999). Contudo, não se sabe se as mudanças ocorridas são acompanhadas por um aumento de função dos receptores (Buisson e Bertrand, 2002).

Além disso, a supra-regulação tem sido evidenciada em diferentes idades de exposição à nicotina. Particularmente, tem sido demonstrado que a exposição durante o desenvolvimento promove efeitos mais intensos e duradouros. Interessantemente, tem sido constantemente demonstrado que a exposição à nicotina na adolescência promove a supra-regulação de modo mais robusto e persistente quando comparados com adultos (Abreu-Villaça et al., 2003a; Doura et al., 2008; Trauth et al., 1999).

No entanto a fumaça produzida pela queima do cigarro contem mais de 4500 componentes além da nicotina. E, apesar de nas últimas quatro décadas esta figurar como o componente principal que promove e apoia o vício do tabaco (para revisão: Fowler et al. 2008; Slotkin 2002; Watkins, et al., 2000), estudos recentes têm demonstrado que outros componentes também presentes na fumaça são capazes de desempenhar um importante papel neste processo, atuando em conjunto com a nicotina ou de forma isolada, assim como já foi demonstrado para o acetaldeído (um produto da combustão de polissacáridos) e a nornicotina (um alcaloide vegetal presente também nas folhas de tabaco) que isoladamente tem potencial aditivo (Hoffman e Evans, 2013). Foi demonstrado também que concentrações crescentes da substância anabasina causa alterações em padrão bifásico, aumentando a autoadministração de nicotina em doses baixas e reduzindo as infusões em doses mais elevadas. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que um pré-tratamento com a substância anatabine reduziu quase que pela metade a autoadministração de nicotina (Hall et al., 2014). Ambos são alcaloides presentes na folha do tabaco (Huang e Hsieh, 2007) e apresentam estrutura química semelhante a nicotina, apresentando inclusive afinidade por receptores do tipo nAChRs (Crooks e Dwoskin, 1997; Maciuk et al., 2008). Assim, estes e outros achados evidenciam que constituintes não-nicotínicos presentes na fumaça do cigarro contribuem para o vício e que diferentes produtos de tabaco, contendo diferentes níveis destes constituintes, podem apresentar diferentes potenciais para o abuso (Brennan et al., 2013).

Outros trabalhos focam em inibidores da monoamino oxidase (MAO), que também estão presentes em abundância na fumaça do cigarro (Fowler et al., 2003). Uma vez que esta enzima metaboliza monoaminas, inibir a MAO pode resultar em um aumento dos níveis sinápticos de dopamina liberadas pela nicotina, potencializando assim os seus efeitos de reforço (Berlin e Anthenelli, 2001; Fowler et al, 2003;. Lewis et al, 2007).

Inibidores como a norharmane, uma beta-carbolina naturalmente encontrada em folhas de tabaco (Poindexter e Carpenter, 1962), que inibe reversivelmente tanto a MAO-A quanto a MAO-B (Herraiz e Chaparro, 2005), quando administrada sozinha foi capaz de gerar comportamento de reforço (a autoadministração de nicotina) e, quando combinada com a nicotina, causou intensificação deste comportamento (Guillem et al. 2005; Arnold et al., 2014). Em outros casos este comportamento permaneceu por mais tempo (Villégier et al., 2003), como no caso dos inibidores tranilcipromina e pargilina que, quando veiculados junto com a nicotina, causam sensibilização comportamental (neste caso foi um aumento progressivo na resposta locomotora).

Estes trabalhos sugerem que os constituintes além da nicotina podem ter efeitos centrais de ativação da dependência, fundamentando a necessidade da inclusão destes em investigações pré-clínicas de dependência do tabaco. Assim, os tabagistas se expõem a um número considerável de substâncias que estão presentes na fumaça do tabaco que podem agir independentemente de ou interagir com nicotina, afetando o sistema nervoso central.

Álcool e Nicotina

Álcool e tabaco estão no topo da lista das substâncias psicoativas amplamente usadas e abusadas no mundo (DiFranza e Guerrera, 1990; Larsson e Engel, 2004), e não só isso, também está claro que o tabagismo e o consumo de álcool estão inextricavelmente ligados (Grant, 1998; Miller e Gold, 1998; Dawson, 2000; Meyerhoff et al., 2006). De fato, estudos epidemiológicos demonstram claramente a forte correlação entre o uso destas duas substâncias. Em alcoolistas, as taxas de fumantes superam os 80%, enquanto que entre os tabagistas 30% demonstram ter problemas com bebidas (Batel et al., 1995; Miller and Gold, 1998; Larsson e Engel, 2004).

Já foi demonstrado também que, indivíduos que são dependentes de álcool apresentam uma frequência maior de dependência da nicotina em relação a aqueles que não bebem (Hashimoto et al., 2001). A dependência para o álcool também parece ser mais forte em indivíduos que apresentam dependência pra a nicotina (Marks et al., 1997). Tabagistas

consomem duas vezes mais álcool do que não tabagistas, e alcoolistas que fumam consomem mais cigarros do que não alcoolistas que fumam (Carmody et al., 1985; Dawson, 2000; DiFranza and Guerrero, 1990; Larsson and Engel, 2004; Meyerhoff et al., 2006; Patten et al., 1996).

Foi demonstrado que a exposição concomitante de nicotina e álcool durante a adolescência é capaz de promover supra-regulação mais forte do receptor nAChR subtipo $\alpha 4\beta 2$ no córtex cerebral e no mesencéfalo quando comparada com a exposição a esses mesmos agentes de forma isolada, o que sugere que a exposição combinada leva à alterações na transmissão colinérgica de forma diferenciada (Ribeiro e Carvalho et al., 2008, 2009). Em ratos adultos, a co-exposição resulta em um aumento da liberação de dopamina no núcleo accumbente, efeito este que acredita-se ser mediado por nAChRs (Tizabi et al., 2007). Corroborando com estes achados, foi demonstrado que o álcool melhora o fluxo de ions induzido por agonista através dos nAChRs (Aistrup et al., 1999; Cardoso et al., 1999). Foi demonstrado também que o álcool é capaz de induzir atividade locomotora e de aumentar a liberação de dopamina no sistema mesolímbico, ambas ações que envolvem a ativação de nAChR (Blomqvist et al., 1992; Soderpalm et al., 2000).

Em estudos comportamentais, a nicotina e o álcool demonstraram afetar os níveis de ansiedade, memória e aprendizado durante a adolescência, comportamentos sabidamente modulados pelo sistema colinérgico (File et al., 2000; Ricceri et al., 2002; Hasselmo, 2006; Degroot e Treit, 2002; Dani e Bertrand, 2007; Abreu-Villaça et al., 2007, 2008; Engin e Treit, 2007; Viveros et al., 2007), tornando, pelo menos em parte, o sistema colinérgico (receptores do tipo nAChRs principalmente) um sítio de interação entre nicotina e álcool.

Uma vez que já foi demonstrada a importância dos nAChRs para diversas atividades e também para o desenvolvimento do sistema nervoso, fica evidente que tanto a nicotina/tabacco, quanto o etanol são capazes de ocasionar alterações graves não somente no funcionamento, mas principalmente na formação do sistema nervoso (Navarro et al., 1989; Slikker et al., 2005) o que explicaria, pelo menos em parte, as profundas mudanças no cérebro e comportamento resultantes da exposição precoce a estas drogas de abuso.

Desenvolvimento

Durante o desenvolvimento, podemos observar no sistema nervoso um período de formação mais extenso que o de outros órgãos. Em humanos, este processo se inicia no período pré-natal por volta do 12º dia gestacional, onde se observa o início da formação da

placa neural, que futuramente dará origem às diferentes segmentos deste sistema em humanos (para revisão: Greene e Copp, 2009). A formação do sistema nervoso permanece de forma intensa e continua durante grande parte do período pós-natal. No decorrer deste tempo ocorrem eventos como proliferação de neurônios, apoptose, formação e rearranjos sinápticos em diversas regiões cerebrais (Altman e Bayer 1990, Bayer 1983, Bayer et al. 1982, Huttenlocher 1990, McWilliams e Lynch 1983, Spear 2000). Desta forma, muito tem se discutido a respeito de sua vulnerabilidade, principalmente em decorrência de exposições a agentes externos.

Exposição ao Álcool Durante o Desenvolvimento

O consumo de álcool por gestantes é um grave problema de saúde pública. Entre as mulheres, estima-se que entre 13 e 20% consomem bebidas alcoólicas durante a gestação (Balachova et al., 2011; CDC, 2009; Senecky et al., 2011). Em acordo com esta ideia, vários estudos têm associado o consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação como a principal causa de retardo mental no mundo (Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007).

Os primeiros estudos que chamaram a atenção da comunidade científica para os efeitos teratogênicos do álcool foram realizados no início dos anos 70. Em 1973, Ken Jones, David Smith e colaboradores publicaram dois trabalhos descrevendo um conjunto de características comuns em 11 crianças cujas mães reconhecidamente consumiram grandes quantidades de álcool durante a gravidez (Jones et al., 1973; Jones e Smith, 1973). Estas características foram reunidas em três grandes grupos: 1) deficiência no crescimento e baixo peso; 2) malformações faciais como: nariz pequeno, lábio inferior fino, retração de pálpebras; e 3) danos no sistema nervoso central que incluem microcefalia e geralmente retardo mental. O conjunto destas características foi denominado por estes autores como Síndrome Alcoólica Fetal (FAS, Fetal Alcohol Syndrome).

Atualmente é bem aceita a ideia de que a FAS constitui a forma mais severa de dano causado pela exposição gestacional ao etanol, geralmente associado com o consumo abusivo de bebidas alcoólicas observado em alcoolistas (Goodlett et al., 2005; Riley e McGee, 2005). Em indivíduos cujas mães não são alcoolistas e, portanto, ingeriram quantidades menores de etanol, os efeitos do álcool podem se manifestar de forma mais branda (geralmente como uma síndrome parcial, sem a presença das alterações craniofaciais, se limitando apenas a alguns distúrbios neurocomportamentais ou ao retardo de crescimento). Nestes casos, diversos termos foram cunhados por profissionais da área de saúde e pesquisadores para nomear os

defeitos decorrentes da exposição ao etanol durante o período gestacional (Mukherjee et al., 2006; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007).

Dentre os mais utilizados estão a Desordem Neurocomportamental Relacionada ao Álcool (ARND, *Alcohol Related Neurobehavioral Disorder*), Defeitos de Nascimento Relacionados ao Álcool (ARBD, *Alcohol-Related Birth Defects*) e Efeitos do Álcool no Feto (FAE, *Fetal Alcohol Effects*). Em abril de 2004, em um encontro envolvendo o NIH (National Institutes of Health), o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), o SAMHSA (*Substance Abuse and Mental Health Services Administration*) e pesquisadores com reconhecida proficiência na área foi proposta a sigla FASD (*Fetal Alcohol Spectrum Disorder*), que desde então, é o termo utilizado internacionalmente para nomear a grande variedade de defeitos que podem ser observados em um indivíduo cuja mãe ingeriu álcool durante a gravidez (Mukherjee et al., 2006; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007).

Estima-se que a prevalência da FASD seja de 9,1 casos por 1000 nascimentos (May et al., 2009; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007), taxa esta que é duas vezes maior que a das duas alterações congênitas mais comuns (síndrome de Down e espinha bífida) combinadas (May e Gossage, 2001; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007). Quando as análises se restringem a crianças e adolescentes em idade escolar, estes números são ainda maiores, variando entre 2 a 5% em países em desenvolvimento (May et al., 2009; May et al., 2011; Riley et al., 2011).

Devido a extrema sensibilidade do tecido nervoso durante o desenvolvimento, os amplos espectros de defeitos neurológicos e comportamentais decorrentes do consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação podem persistir ao longo da vida (Hannigan e Armant, 2000; Spohr et al., 2007; Welch-Carre, 2005). Estudos post-mortem em cérebros de crianças diagnosticadas com FAS revelaram alterações morfológicas como microencefalia, hidrocefalia, heterotopias neurogliais, anomalias ventriculares, agenesia do corpo caloso e malformações cerebelares (Clarren, 1986). Estudos mais recentes utilizando ressonância magnética combinada à análises quantitativas têm indicado que áreas específicas do cérebro, tais como os gânglios da base, o corpo caloso e partes do cerebelo são particularmente mais susceptíveis aos efeitos teratogênicos do álcool (Mattson et al., 2001; Roebuck et al., 1998; Sowell et al., 2001).

Dentre os distúrbios neurocomportamentais mais frequentemente observados estão o transtorno o TDAH (Burd et al., 2003) e os déficits de aprendizado e memória (Acheson et al., 2001; Harris et al., 1995). O TDAH é possivelmente a característica mais marcante em crianças expostas ao álcool durante a gestação (Bhatara et al., 2006; Burd et al., 2003; Doig et

al., 2008), tendo sua prevalência em torno de 41% dos casos (Bhatara et al., 2006). Em crianças com FAS, a comorbidade com o TDAH varia entre 73% (Burd et al., 2003) e 95% (Fryer et al., 2007).

Déficits de aprendizado e de memória podem ser avaliados por medidas de desempenho acadêmico, em tarefas matemáticas e de leitura e em testes de QI (Coles et al., 1991; Streissguth et al., 1989; Streissguth et al., 1994) e podem envolver o comprometimento de diversos tipos de memória tais como a operacional, a de curto prazo, a espacial e a habituação (Kodituwakku et al., 1995; Rasmussen, 2005; Streissguth et al., 1989; Uecker e Nadel, 1996).

A manifestação dos efeitos deletérios da exposição pré-natal do sistema nervoso ao álcool pode variar de modo considerável entre indivíduos e entre estudos (Hannigan e Berman, 2000; Stratton et al., 1996). De modo geral, o grau com que os déficits neurológicos e comportamentais se manifestam parece variar em função da quantidade de álcool consumida pela mãe, da frequência e/ou padrão de consumo e dos picos de concentração alcoólica no sangue (Klintsova et al., 2000). Além disso, fatores não associados à quantidade de álcool ingerido pela mãe durante a gestação também contribuem para a manifestação da FASD (Hannigan et al., 2007; Welch-Carre, 2005). Além dos fatores de risco genéticos (MacCarver et al., 1997), um grande número de fatores ambientais, amplamente associados com a pobreza, tais como subnutrição e a maior probabilidade de contato com contaminantes ambientais podem contribuir para teratogenicidade do álcool (Hannigan et al., 2007; Welch-Carre, 2005). Além disso, o tabagismo, cafeína e drogas (de abuso ou não) também podem exercer seu papel. Tais fatores ambientais podem interagir com ou exacerbar os efeitos da exposição ao álcool (Hannigan et al., 2007; Hannigan e Berman, 2000), e o alcoolismo pode, por sua vez contribuir em muito para que muitas dessas circunstâncias ambientais manifestem seus efeitos.

Vale mencionar que, apesar dos esforços feitos em diversos países para informar a respeito dos riscos do consumo de álcool durante a gestação, o número de casos envolvendo indivíduos com distúrbios decorrentes do consumo de etanol durante a gestação tem se mantido relativamente estável ao longo dos últimos anos (Riley et al., 2011; Spohr et al., 2007).

Os efeitos da exposição ao etanol durante o desenvolvimento variam em função do período de exposição, sendo que o terceiro trimestre da gestação de humanos parece ser um período de grande susceptibilidade (Nunes et al., 2011). Um marco do desenvolvimento neural normalmente utilizado para balizar o estágio de desenvolvimento de roedores e

humanos é o período de surto de crescimento neural (do inglês, *brain growth spurt*) (Dobbing e Sands 1979). Este período, caracterizado pelo crescimento exponencial do cérebro, se inicia em humanos no início do terceiro trimestre de gestação e tem seu pico por volta do nascimento. Em ratos e camundongos o surto de crescimento cerebral se inicia no dia do nascimento e tem seu pico por volta do décimo dia pós-natal (Bandeira et al., 2009; Dobbing e Sands 1979). Assim, uma observação interessante é que o sistema nervoso do roedor ao nascer é consideravelmente menos maduro que o sistema nervoso humano (Clancy et al., 2007; Maier et al., 1999). Os primeiros 10 dias de vida pós-natal do roedor podem ser comparados ao terceiro trimestre da gestação humana (Bayer et al., 1993; Dwyer et al., 2008; Quinn, 2005), um período de intensa sinaptogênese durante o qual o cérebro humano se desenvolve rapidamente. Desse modo, algumas estruturas, como o neocórtex, o hipocampo e o cerebelo, que se desenvolvem de modo marcante em humanos durante o último trimestre gestacional, em ratos e camundongos, desenvolvem-se após o nascimento (Bandeira et al., 2009; Dobbing e Sands 1979; Hannigan e Berman 2000).

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

Exposição ao Tabaco/Nicotina Durante o Desenvolvimento

Ainda não se conhecem todas as substâncias do tabaco que lesam a placenta, atuam sobre o equilíbrio hormonal da grávida e prejudicam o desenvolvimento do feto. Gestantes

que fumam dois cigarros, em 10 minutos, acusam aumento de até 60% de adrenalina e noradrenalina no plasma sanguíneo e elevação do nível de vasopressina. Essas e outras catecolaminas atravessam a placenta, concentram-se no líquido amniótico e no sangue fetal. Pela vasoconstrição que provocam, reduzem o fluxo sanguíneo na placenta, o qual pode diminuir em até 22%. Um estudo anterior demonstrou a presença de nicotina e cotinina, um produto derivado da metabolização da nicotina, no líquido amniótico, respectivamente, nas concentrações de 31ng/ml e 129ng/ml. A dosagem da nicotina no sangue do cordão umbilical mostra concentrações tanto mais elevadas quanto menor é o intervalo entre a gestante fumar um cigarro e o momento do parto (Assmussen, 1977; Bloter e Alberman, 1969; Lehtovirta e Forss, 1978; Luck et al., 1982; Naeye et al., 1997; Quinley et al., 1979; Van et al., 1992; Wilson, 1971).

O aporte de oxigênio às células da placenta e ao feto, diminuído pela vasoconstrição, é agravado pela intervenção de outro fator que é a carboxihemoglobina, resultante da combinação do monóxido de carbono produzido pela queima do cigarro, e a hemoglobina do sangue. As concentrações de carboxihemoglobina no sangue de gestantes podem atingir 7% a 9%, enquanto nas abstinências não chega a 1%. Com a diminuição do fluxo sanguíneo e do oxigênio, constata-se, pelo termograma, queda da temperatura. Todo esse processo provoca menor desenvolvimento estrutural, lesões nas vilosidades da placenta e o aumento compensatório desta em relação ao feto. Isso, associado ao aumento das contrações musculares do útero, eleva o risco do descolamento precoce da placenta (Assmussen, 1977; Bloter e Alberman, 1969; Lehtovirta e Forss, 1978; Luck et al., 1982; Naeye et al., 1997; Quinley et al., 1979; Van et al., 1992; Wilson, 1971).

Em animais, a administração de nicotina prolonga a gestação pelo retardamento da implantação do óvulo e há maior frequência de sua nidação na trompa. Em mulheres gestantes que fumam, isso é também constatado (Bouyer, 2003). Os distúrbios crônicos de diminuição do fluxo sanguíneo, a hipóxia e a queda de temperatura aumentam a incidência de aborto, conforme já foi amplamente documentado (Abel, 1990; Bluter e Alberman, 1969; Kline et al., 1977; Stergachis et al., 1991; Yoshinaba et al., 1979).

Evidencias epidemiológicas apontam para uma correlação forte entre o tabagismo materno e o aumento da mortalidade infantil (Fleming e Blair, 2007). No entanto, os mecanismos que levam a este quadro ainda são desconhecidos, acredita-se que mecanismos do controle cardiovascular fraco e pausas respiratórias sufocantes (apnéia) sejam fatores importantes (Moon et al., 2007). Diversos estudos demonstram que a exposição pré-natal a doses baixas de nicotina pode alterar a expressão de nAChRs no centro de controle cardíaco

situado no tronco encefálico resultando em alterações na resposta cardíaca à hipóxia. Esta situação pode contribuir significativamente para etiologia da chamada síndrome da morte súbita infantil. O menor suprimento de sangue e de oxigênio, este último agravado pela elevação da carboxihemoglobina, dificultam o crescimento do feto. É maior a incidência de prematuridade, entendida como neonatos abaixo de 2.500 gramas ou pequenos para a idade gestacional (Abernathy et al., 1966; Butler et al., 1972; Goldstein, 1972; Meyer et al., 1974, Rantakallio, 1969).

A nicotina também é eliminada pelo leite materno. Quando a mãe fuma em torno de 7 cigarros em duas horas, os níveis de nicotina no leite chegam até 0,6 mg por litro (Ferguson et al., 1976; Hatcher e Grusby, 1927). As concentrações de nicotina e cotinina na urina do bebê são menores quando se fuma no ambiente familiar do que quando a lactante é tabagista, embora ela se abstenha a fumar durante as mamadas e perto do filho. A nicotina no leite materno intoxica o lactente. Ocorrem vômitos, diarreia e taquicardia nos casos em que a mãe fuma 20 cigarros por dia (Woodward et al., 1986). Caso grave registrou-se com mãe fumando 40 cigarros/dia; após a mamada, o bebê teve intoxicação nicotínica grave, aguda, com apnéia, cianose e hipotonia generalizada (Perraudin, 1978).

Um estudo realizado em 1987 (Slotkin et al., 1987) demonstrou uma redução do DNA total encontrado no cérebro de ratos expostos a nicotina no período gestacional, em comparação ao grupo controle, nas fases finais da gestação e em fases iniciais do desenvolvimento pós-natal. Esta redução na quantidade de DNA reflete uma substancial redução do número de células totais do cérebro em decorrência a exposição à nicotina.

Durante períodos iniciais do desenvolvimento, a nicotina promove um aumento da enzima ornitina carboxilase, uma enzima envolvida com biosíntese durante a replicação e a diferenciação celular. Esta resposta devido a estimulação precoce de nAChRs sugere que a nicotina exógena pode desencadear uma proliferação neural aberrante (Slotkin et al., 1987; Navarro et al., 1989). Juntamente com os efeitos sobre a proliferação celular, a nicotina também é capaz de produzir alterações na síntese de hormônios adrenais e gonadais. Mesmo baixas doses (2mg/kg/dia) em roedores são capazes de aumentar corticosterona no plasma de filhotes machos em G18 (von Ziegler et al., 1991). Este aumento de corticosterona no feto inibe a produção de testosterona nas gônadas de machos em G19, momento crítico em que a testosterona atua para o dimorfismo sexual no cérebro em desenvolvimento (Sarasin et al., 2003).

Receptores nAChRs são de suma importância para o desenvolvimento do sistema nervoso. Eles são amplamente expressos no feto, com aumento transitório de densidade

numérica em inúmeras regiões cerebrais durante períodos críticos do desenvolvimento. Os componentes do sistema colinérgico são relevantes à muitos eventos que ocorrem durante este período no sistema nervoso central, incluindo proliferação e diferenciação de células progenitoras, neurogênese, gliogênese, maturação e plasticidade neuronal, migração axonal, regulação de expressão gênica e sobrevivência celular. (para revisão ver Abreu-Villaça et al., 2010a).

Com isso, diversos estudos tem então demonstrado que a exposição à agentes externos como a nicotina é capaz de causar alterações no cérebro em desenvolvimento. Nesse sentido, a exposição gestacional a nicotina é capaz de modificar a densidade da expressão de nAChRs durante as fases pré e pós-natal. Tal exposição aumenta a ligação de nAChRs de alta afinidade em cérebros de neonatos como um todo, bem como em regiões específicas (Slotkin et al., 1987; Navarro et al., 1989; Pentel et al., 2006). Dentre estes padrões de alterações, uma supra-regulação pós-natal mais restrita apresenta-se no dia pós-natal (PN) 18 no córtex somatosensorial e visual (Tizabi e Perry, 2000). Mais tardiamente, na adolescência (em PN35 e em PN38), ocorre uma inversão deste padrão com um decréscimo na expressão de nAChRs na substância negra, na área do tegumento ventral, no córtex pré-frontal (PFC) e no NAcc (Chen et al., 2005). Também ocorre decréscimo de ligação para nAChRs $\alpha 7$ no giro denteado e na região CA1 do hipocampo (Tizabi et al., 2000).

Exposição à nicotina pré-natal pode supra-regular receptores nAChRs funcionais em várias regiões do cérebro de roedores, que incluem também áreas envolvidas na processamento da recompensa como a área tegmental ventral (VTA) e o NAcc (Slotkin et al., 1987; Nordbrg et al., 1991; Shacka e Robinson, 1998; Abreu-Vilaça et al., 2004; Chen et al., 2005; Huang et al., 2007). Mesmo quando a exposição ocorre no período neonatal imediato (Miao et al., 1998) tal alteração pode ocorrer, e pode persistir por um longo tempo após a retirada. Com a interrupção da exposição à nicotina, em algumas regiões cerebrais, há descrição de infra-regulação de nAChR. Animais expostos durante o período neonatal apresentam uma redução significativa no numero de receptores no córtex cerebral após 90 dias de vida do animal (75 dias após a interrupção da administração de nicotina).

A complexidade dos perfis de expressão das subunidades de nAChRs durante o desenvolvimento e a gama de propriedades resultantes da combinação destas subunidades sugerem que a exposição gestacional a nicotina pode causar alterações cerebrais no desenvolvimento através de mecanismos distintos dependendo do tempo, quantidade e duração da exposição. Estes intrincados padrões de complexidade do desenvolvimento do sistema colinérgico, e os impactos em longo prazo de uma exposição limitada à nicotina

durante as fases iniciais do desenvolvimento cerebral, levaram, juntamente com estes achados gerais, a muitos estudos dedicados a elucidar o papel da exposição à nicotina no desenvolvimento de algumas desordens clínicas.

Efeitos relacionados com a exposição materna à nicotina incluem uma maior atividade da enzima colina acetiltransferase, enzima esta responsável pela síntese da acetilcolina, e uma diminuição no número de transportadores de colina, que atuam na recaptação de colina, o que mostra que a exposição *in utero* induz alterações no sistema colinérgico (Abreu-Villaça et al., 2004). As alterações na enzima colina acetiltransferase e no número de transportadores de colina também podem ser vistas após muito tempo da exposição à nicotina no desenvolvimento, com aumento na expressão de ambas (Nunes-Freitas et al., 2011). Além disso, tem sido mostrado que a nicotina, quando administrada no período pré-natal, é capaz de mudar a permeabilidade de canais específicos de membrana que medeiam as correntes que contribuem para a excitabilidade celular (Good et al., 2006; Pilarski et al., 2001).

Susceptibilidade

O consumo de produtos que contenham nicotina em sua composição é um pré-requisito óbvio para que se desencadeie o processo de dependência pela nicotina. No entanto, cabe notar que para alguns indivíduos, o consumo de baixas doses de nicotina já é suficiente para fazer com que estes apresentem sinais de dependência pela droga, enquanto que, por outro lado, outros são capazes de consumir grandes quantidades sem experimentarem quaisquer sinais de dependência (DiFranza et al., 2002). Exemplos como este são importantes uma vez que, diferenças individuais na susceptibilidade à dependência pela nicotina bem como a outras drogas de abuso têm sido naturalmente ligadas a variações genéticas (Chen et al., 2012; Li e Burmeister, 2009; Russo et al., 2011). Adicionalmente, outros fatores como alterações neurobiológicas em diferentes estágios do desenvolvimento e diversos estímulos ambientais podem ainda aumentar a susceptibilidade individual a dependência de drogas (True et al., 1997).

Analisando as informações que temos hoje sobre o uso e abuso de drogas e o início do uso de tais substâncias, vários fatores podem estar associados como fatores de risco, tais como: comportamento (Blackson e Tarter, 1994; Brooks et al., 1990; Donovan et al., 1991; Giancola et al., 1996; Mezzich, Tarter et al., 1995; Van Kammen et al., 1991), cognição (Giancola et al., 1996; Moss et al., 1994), componentes afetivos (Caprara et al., 1985; Cornelius et al., 1994; Henry et al., 1993; Lerner e Vacary, 1984), componentes ambientais

(Block et al., 1988; Duffy e Coates, 1989; Flay, 1985; Weinberg et al., 1994), e fatores genéticos (Carmelli et al., 1992; Hughes, 1986; Pomerleau, 1995; Pomerleau, Collins et al., 1993). No entanto, dois períodos parecem ser fundamentais para a experimentação e o uso de substâncias: A adolescência e o período gestacional (Cornelius et al., 2000; Escolaridade e Kuh, 2002).

Particularmente, vários estudos suportam uma correlação positiva em que os indivíduos expostos à nicotina durante o período pré-natal têm um maior risco de se tornarem dependentes de substâncias, especialmente durante o período da adolescência (Kandel et al., 1994; Griesler e Kandel, 1998; Fergusson et al., 1998, 2005; Cornelius et al., 2000, 2005; Buka et al., 2003; Lieb et al., 2003; Schooling e Kuh, 2002; Al et al., 2006).

Exposição Pré-Natal à Drogas Como Fator de Aumento a Suscetibilidade

Interessantemente, há inúmeras evidências de que a exposição a drogas de abuso durante o desenvolvimento pré-natal aumentam a suscetibilidade a drogas de abuso na adolescência e na idade adulta (Abreu-Villaça et al., 2004a, 2004b; Barbier et al. 2009; Matta & Elberger, 2007),

Estudos clínicos têm reportado que a exposição fetal ao álcool tem a capacidade de aumentar a dependência para o próprio álcool como também para outras drogas de abuso (Famy et al., 1998; Yates et al., 1998; Baer et al., 1998, 2003; Alati et al., 2006). Esta evidência epidemiológica também foi sugerida em estudos pré-clínicos. Numerosos efeitos neurocomportamentais foram detectados em animais após exposição ao etanol, pré e/ou pós-parto e, entre eles, foi constatado que a exposição ao etanol precoce pode proporcionar aumento posterior da ingestão de etanol em roedores (Lança e Molina., 2005; Chotro et al., 2007). Estudos anteriores demonstraram resposta alterada aos efeitos hipotérmicos de diferentes drogas de abuso, tais como etanol (Abel et al., 1981; Taylor et al., 1981) e morfina (Nelson et al., 1986), após a exposição pré-natal ao etanol.

Diversos estudos epidemiológicos sugerem uma correlação positiva entre o tabagismo materno durante a gravidez e risco do tabagismo e dependência à nicotina entre os filhos (Mamus et al., 2006; Cornelius et al., 2000). Em estudos com animais também foram obtidos resultados que indicaram que a exposição pré-natal à nicotina, pode afetar a suscetibilidade ao uso do tabaco mais tarde entre a prole oriunda de fêmeas expostas (Slotkin et al., 1991; Smith et al., 1991; Al et al., 2006; Buka et al., 2003; Kandel et al., 1994; Lieb et al., 2003; Niaura et al., 2001).

Tabagismo materno durante a gravidez também está associado com exposição da prole em ambiente familiar à fumaça de cigarro, fazendo com que seja associado o tabagismo a uma prática social comum. Este fator, bem como a exposição passiva ao cigarro são fortes indicadores que levam ao início de hábitos tabagistas (Racico et al., 2013; Racico et al., 2011). No entanto, um estudo que comparou os padrões de consumo entre indivíduos expostos em útero a nicotina e indivíduos cuja mãe parou de fumar durante a gravidez e depois retomou a prática mostrou que somente indivíduos expostos a nicotina pré-natal apresentaram um aumento na predisposição de se tornarem dependentes do cigarro em idade precoce (Al et al., 2006). As alterações na susceptibilidade sugerem que exposição a nicotina pré-natal induz a alterações neurobiológicas que predis põem o indivíduo exposto a dependência da nicotina. Um aumento no risco do desenvolvimento da dependência a outras drogas de abuso também é relacionado com o tabagismo pré-natal (Brennan et al., 2002).

Enquanto a alta suscetibilidade de indivíduos expostos em útero à drogas de abuso se tornarem dependentes mais tarde durante a vida pós-natal têm sido demonstrado, os mecanismos responsáveis permanecem por serem ainda elucidados. A investigação de alterações neurobiológicas que resultem em um aumento tardio da vulnerabilidade a propriedades aditivas em indivíduos expostos durante o período pré-natal é de grande importância para o desenvolvimento de mecanismos terapêuticos específicos elaborados para auxiliar as tentativas de abandonar o vício ou ao menos diminuir a susceptibilidade a dependência nestes indivíduos.

Mecanismos de Recompensa

Ainda não foram determinadas se a exposição pré-natal e/ou neonatal imediata à fumaça de cigarro, ou, a fumaça conjugada com álcool são capazes de induzir alterações que resultem em uma aumentada susceptibilidade à dependência à nicotina, nem tão pouco foram esclarecidos quais os mecanismos envolvidos na susceptibilidade produzidas através da exposição precoce à diferentes drogas.

No entanto, alterações do sistema de recompensa podem ser um importante componente para a facilitação da dependência. Alterações induzidas pela nicotina e o álcool em grupos neuronais associadas com o sistema de recompensa, são passíveis de contribuir para a exposição pré-natal associada à geração do vício. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a exposição a substâncias que interfiram neste sistema durante o período pré-

natal é capaz de induzir alterações no circuito neurobiológico associados com a recompensa e desta forma gerar um sistema mais susceptível ao vício.

Um traço comum entre todos os tipos de abuso de drogas, e que se acredite que seja a principal característica deste tipo de substância, e que cause a dependência, é a geração de um efeito recompensa a partir da administração destas substâncias (Di e Imperato, 1988; Drevets et al., 2001; Wise, 1996). Redes neuronais envolvidas na mediação da recompensa são de interesse quando se examinam os mecanismos neuronais envolvidos no desenvolvimento da dependência por drogas. Em mamíferos, a sinalização neuronal entre a área tegumental ventral (VTA), o núcleo acumbens (NAcc) e o córtex pré-frontal (PFC), usualmente referida como via de recompensa ou circuitaria de recompensa, é particularmente importante em mediar os efeitos de recompensa e a euforia (Brenhouse et al., 2008; Corrigall et al., 1994; Corrigall et al., 1992; Drevets et al., 2001; Schultz, 1998). A mediação da recompensa através deste circuito exerce um importante papel no comportamento motivado que é essencial para sobrevivência, incluindo a ingestão alimentar e a interação social e sexual.

A região VTA é formada por neurônios dopaminérgicos (DA) e GABAérgicos que projetam para diversas regiões (Swanson, 1982), no entanto, tem sido demonstrado que projeções dopaminérgicas para NAcc (via mesoaccumbens) desempenham um papel crucial na atribuição das características de recompensa mediadas por drogas. Através desta via, drogas aditivas, provocam um aumento na liberação de dopamina no NAcc (Drevets et al., 2001; Filip et al., 2000; Pontieri et al., 1995; Pontieri et al., 1996), enquanto a administração de drogas que não possuem um grande potencial aditivo não são capazes de provocar esta liberação de dopamina no NAcc (Di e Imperato, 1988).

Em humanos, as sensações de recompensa experimentadas a partir do uso de drogas aditivas são positivamente correlacionadas com a indução por parte das drogas aditivas do aumento dos níveis de dopamina no estriato ventral, que inclui o NAcc (Drevets et al., 2001; Volkow et al., 2002; Volkow et al., 1996b). Esta resposta fica reduzida com a inibição da atividade neural de VTA, que também diminui bastante a auto administração de drogas aditivas (Brebner et al., 2000; Corrigall et al., 1994; David et al., 2002; Shoaib et al., 1998; Xi e Stein, 1999). Somando-se a isto, a auto estimulação elétrica direta em VTA é realizada por animais experimentais, o que também aumenta os níveis de dopamina em NAcc (Fibiger et al., 1987; Fiorino et al., 1993; OLDS e MILNER, 1954).

Acredita-se que os aumentos nos níveis de dopamina em NAcc, associados com recompensa (Drevets et al., 2001), são dependentes do envio de mensagens (quantidade de disparos realizados) dos neurônios dopaminérgicos presentes em VTA, que liberam grandes

quantidades de dopamina em NAcc quando comparados a liberação de dopamina em condições normais (Floresco et al., 2003; Gonon, 1988). Estudos em que a frequência de disparos neuronais pode ser correlacionada com o comportamento revelado por macacos, neurônios dopaminérgicos de VTA se tornaram ativados quando os animais foram apresentados a uma recompensa (Mirenowicz e Schultz, 1996; Schultz et al., 1998; Schultz et al., 1993). Juntamente a isso, a indução de disparos em neurônios dopaminérgicos é suficiente para induzir comportamentos de recompensa. Todos estes estudos corroboram o fato de que as altas frequências de disparos realizados pelos neurônios dopaminérgicos de VTA são comportamentalmente relevantes para o padrão de disparos que induzem a recompensa e desenvolvem a dependência de drogas.

A administração de nicotina ativa as vias de recompensa e aumenta os níveis de dopamina no NAcc (Pontieri et al., 1996), um aumento que têm sido demonstrado ser dependente da ativação nicotínica de nAChRs localizados em VTA. Microinjeções de um antagonista nicotínico em VTA foram capazes de diminuir os níveis de dopamina em NAcc em resposta a administração de nicotina. Em estudos de auto administração com roedores, antagonistas nicotínicos foram capazes de reduzir o número de infusões de nicotina comparado em condições controle (Corrigall et al., 1994; Di e Imperato, 1988; Nisell et al., 1994^a; Nisell et al., 1994b). Ratos knock-outs em que as subunidades de nAChR $\beta 2$, $\alpha 4$ ou $\alpha 6$ foram removidas não apresentaram sucesso nos testes de auto administração porém a re-expressão seletiva destas subunidades de nAChR em VTA, usando vetores virais, reestabeleceram o sucesso nos testes de autoadministração de nicotina (Pons et al., 2008). Observando tais estudos, demonstram a importância da ativação de nAChR em VTA para que seja mediada as propriedades de recompensa da nicotina.

Em VTA, a composição das subunidades de nAChRs varia dependendo do fenótipo do neurônio, e dados sugerem que estas diferenças são de importância funcional. Subunidades do tipo $\beta 2$ foram encontradas em nAChRs de neurônios que enviam mensagens GABAérgicas para células dopaminérgicas, enquanto que nAChRs com subunidades $\alpha 7$ foram encontrados em terminais de neurônios que enviam sinais glutamatérgicos, o que sugere que a nicotina pode sensibilizar nAChRs de formas diferentes levando sinais excitatórios e inibitórios a células dopaminérgicas de VTA. De fato, a exposição à nicotina, em concentrações igualmente encontradas em cigarros, por aproximadamente 10 minutos, é capaz de afetar de forma transitória as transmissões GABAérgicas, após este período o que ocorre é uma depressão persistente destas transmissões devido ao grande número de nAChRs dessensibilizados. Porém, respostas excitatórias, transmissões glutamatérgicas, podem ser

facilmente evocadas de forma simultânea. Isso indica que primariamente da nicotina causa excitação de terminais de glutamato e desinibição de terminais GABAérgicos (Mansvelder et al., 2002; Mansvelder e McGehee, 2000), e que estas diferenças espaciais e temporais na atividade do receptor nicotínico de ambos os neurônios excitatórios e inibitórios em áreas de recompensa (como VTA) coordenam e reforçar a auto-administração de nicotina (Tolu et al., 2013).

Além disso, evidências originadas de estudos usando camundongos geneticamente modificados, nos quais as subunidades $\alpha 4$ e $\beta 2$ foram deletadas, sugerem a participação dos $\alpha 4\beta 2$ nAChRs no processo de estimulação da via mesolímbica dopaminérgica pela nicotina (Rollema et al., 2007). Consequentemente, esse subtipo de receptor tem se tornado um alvo molecular para a criação de novos agentes terapêuticos para a interrupção do hábito de fumar (Rollema et al., 2007).

Acredita-se também que os processos neurobiológicos pelos quais busca e consumo de etanol são estabelecidos e mantidos envolvem vias que mediam o comportamento motivado, tais como o sistema dopaminérgico mesolímbico, tendo sido demonstrado que a administração forçada de etanol aumenta a atividade dopaminérgica no NAcc. Experimentos comportamentais mostram consistentemente que as manipulações farmacológicas da transmissão dopaminérgica no NAcc alteram a resposta para o etanol, apesar de reforço de etanol ser mantido após lesões do sistema de dopamina accumbal. Adicionalmente, há o aumento extracelular de dopamina no NAcc durante a auto-administração operante de etanol, o que é consistente com um papel da dopamina no reforço do etanol. Estudos celulares sugerem que o etanol altera a plasticidade sináptica no sistema mesolímbico, possivelmente através de mecanismos dopaminérgicos, e esta pode ser a base do desenvolvimento de reforço etanol. Assim, estudos anatômicos, farmacológicos, neuroquímicos, celulares e comportamentais estão definindo mais claramente o papel da dopamina mesolímbico de reforço etanol (para revisão, Gonzales et al., 2004).

Núcleo Tegmental Laterodorsal (LDT)

Enquanto a ativação de nAChRs localizados em VTA é considerada um mecanismo importante por trás das propriedades de recompensa de várias drogas de abuso, estudos recentes tem demonstrado que o núcleo tegumental laterodorsal (LDT) também exerce um importante papel no processo de dependência (Lammel et al., 2012; Lodge e Grace, 2006).

Nesse sentido, há evidência recente que a nicotina tem fortes ações excitatórias neste núcleo (Ishibashi et al., 2009).

O LDT está localizado no tronco cerebral com estreita conexão com o núcleo tegumental pedunculopontino (PPT), e juntos, estes 2 núcleos colinérgicos formam o tegumento mesopontino. O PPT têm sido sugerido influenciar o comportamento relacionado à recompensa, incluindo os induzidos pela nicotina (Alderson et al., 2004; Alderson et al., 2006; Lepore e Franklin, 1996). Este núcleo projeta predominantemente para a substância nigra e, em menor quantidade, para VTA (Forter e Blaha, 2003; Oakman et al., 1995).

Embora alguns estudos já tivessem demonstrado que o LDT contém populações separadas de neurônios colinérgicos, glutamatérgicos, e GABAérgicos (Clements e Grant, 1990; Wang e Morales, 2009), outros estudos têm encontrado a co-localização de neurônios colinérgicos e GABAérgicos, indicando que pelo menos uma subpopulação de neurônios de LDT pode estar expressando ACh e GABA (Jia et al., 2003; Mieda et al., 2011). Enquanto LDT projeta para diversas regiões do cérebro (Hallanger et al., 1987; Hallanger e Wainer, 1988; Oakman et al., 1995), as projeções para neurônios dopaminérgicos de VTA são de particular importância para o papel deste núcleo no comportamento relacionado à recompensa. Usando traçadores anterógrado e retrogrado, foi demonstrado que o LDT envia projeções excitatórias (assimétricas) e inibitórias (simétricas) para VTA (Lodge e Grace, 2006).

Uma forte divisão entre projeções assimétricas e simétricas de LDT para os neurônios presentes em VTA da via mesoaccumbal foram encontradas. Nas projeções de LDT sobre os neurônios dopaminérgicos de VTA foram encontradas sinapses assimétricas, e sinapses simétricas foram encontradas em neurônios GABAérgicos. Células dopaminérgicas e GABAérgicas de VTA que projetam para PFC recebem projeções assimétricas e simétricas a partir de LDT. Isto sugere que LDT deve primeiro excitar neurônios dopaminérgicos de VTA da via mesoaccumbal através de mensagens excitatórias de neurônios dopaminérgicos de VTA, mas também através de desinibição de neurônios GABAérgicos de VTA (Omelchenko e Sesack, 2005). Em um estudo realizado posteriormente, uma quantidade de mensagens diretas a partir de projeções colinérgicas aferentes indo para neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos de VTA através da via mesoaccumbal foi demonstrada, o que muito se assemelhava ao que havia sido previamente observado nas projeções aferentes vindas de LDT. Consequentemente, foi sugerido que uma substancial porção da inervação de LDT para VTA é formada por projeções colinérgicas (Omelchenko e Sesack, 2006).

No entanto, um estudo realizado por Lammel e sua equipe, usando marcação anterógrada e retrógrada, demonstrou que as projeções dos neurônios de LDT para VTA são predominantemente glutamatérgicas e que somente uma porção pequena é colinérgica (Lammel et al., 2012). Independente da existência de divergências entre estudos, projeções colinérgicas e glutamatérgicas a partir de LDT para neurônios dopaminérgicos de VTA podem desempenhar um importante papel na mediação de comportamentos associados a dependência. Para dar suporte a esta ideia, a estimulação elétrica de LDT levou a um aumento da taxa inicial dos níveis de dopamina em NAcc o que também pode ser visto através da administração de agonistas de receptores de nicotina ou glutamato em VTA (Forster e Blaha, 2000).

Tem sido descrito que a viabilidade destas projeções é de grande importância para as atividades dos neurônios dopaminérgicos de VTA, e lesões em LDT reduzem os níveis de dopamina em NAcc quando estimulações colinérgicas são aplicadas em VTA (Blaha et al., 1996). Corroborando com isso, um estudo realizado por Lodge e Grace demonstrou que projeções intactas de LDT para VTA são essenciais para a habilidade dos neurônios dopaminérgicos de dispararem com alta frequência (Lodge e Grace, 2006).

Em um estudo feito *in vivo* com a inativação de LDT pela microinjeção de agonistas GABAérgicos ou muscarínicos (ativando receptores muscarínicos inibitórios), foi demonstrada uma pequena redução na média de disparos de neurônios dopaminérgicos em VTA. Seguindo a inativação de LDT, neurônios dopaminérgicos de VTA exibiram taxa de disparo similar ao observado em *in vitro* (Grace e Onn, 1989). Mesmo aplicações diretas de glutamato em VTA foram incapazes de provocar uma alta taxa de disparos e apenas um leve aumento dos disparos normais foi observado (Lodge e Grace, 2006). Somado a isto, foi também visto que a estimulação seletiva de células de LDT que se projetam para VTA levou a comportamentos associados a recompensa, como demonstrado por Lammel e sua equipe (Lammel et al., 2012).

A estimulação de LDT provoca tanto o aumento nos níveis de dopamina em NAcc, como também comportamentos associados com a dependência, assim, a ativação nicotínica de células do LDT, que era de se esperar induzir liberação colinérgica e glutamatérgica em VTA, poderia desempenhar um significativo papel no desenvolvimento da dependência pela nicotina. Em LDT, a presença de mRNA para as subunidades $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ e $\beta 4$ dos receptores nAChRs já foi demonstrada em ratos adultos, enquanto a presença de mRNA para $\alpha 2$ e $\alpha 3$ não foi observada (Azam et al., 2003). No entanto, no tronco cerebral, a presença transitória de mRNA para $\alpha 2$ e $\alpha 3$ já foi demonstrada, desaparecendo 2 semanas após o nascimento (Zhang

et al., 1998), sugerindo que $\alpha 2$ e $\alpha 3$ podem estar presente em neurônios LDT de indivíduos jovens. Enquanto que Azam e sua equipe (Azam et al., 2003) não encontraram a presença de mRNA em LDT, estudos mais recentes, mostrados no atlas cerebral Allen, mostraram grandes quantidades de mRNA para estas subunidades em LDT (Allen Brain Atlas, 2013; Azam et al., 2003).

Em fatias de cérebro, a nicotina têm sido demonstrada como um ativador de receptores pós-sinápticos nAChRs em LDT, que leva a depolarização da membrana em neurônios colinérgicos e não colinérgicos. Atenuações da despolarização de membrana induzida pela nicotina foram possíveis usando antagonistas de nAChRs relativamente seletivos para receptores nAChRs que continham as subunidades $\beta 2$ e/ou $\beta 4$ e $\alpha 7$, indicando a presença pós-sináptica deste tipo de receptor. Um pouco depois, a nicotina também foi apontada por estimular a liberação pré-sináptica de neurotransmissores excitatórios e inibitórios através de nAChRs localizados em terminais pré-sinápticos de neurônios colinérgicos (Ishibashi et al., 2009).

Enquanto alterações temporais na densidade de receptores nAChRs não foram especificamente examinados em LDT, estas alterações têm sido observadas no tronco cerebral de roedores. O número máximo de ligações para nAChRs foi observado por volta de PN7, logo depois, o número de ligações de nAChRs, incluindo presumivelmente os receptores que contenham ligações para $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$, decaem muito por volta de PN21, onde a densidade de marcações se aproxima de um platô (Miao et al., 1998; Zhang et al., 1998). Isto sugere importantes alterações na funcionalidade de nAChRs expressos na membrana celular durante o desenvolvimento, bem como o resultado da exposição em útero de nicotina.

Modelos Animais de Exposição Precoce a Drogas de Abuso

Diversas abordagens podem ser feitas para mimetizar o tabagismo e o consumo de álcool durante a gestação em animais. A maioria destes estudos é realizada em ratos ou camundongos, uma vez que estes compartilham diversas similaridades com o desenvolvimento embrionário humano. No entanto existem algumas diferenças importantes que devem ser levadas em consideração.

Particularmente interessante é o fato de que, em relação ao desenvolvimento do sistema nervoso central, o período pós-natal recente de roedores corresponde ao terceiro trimestre da gestação de seres humanos (para revisão: Bayer et al., 1993; Dwyer et al. 2008 Quinn, 2005). Desta forma, a exposição de roedores à agentes externos durante as primeiras 2

semanas de lactação permite um paralelo para a identificação de mecanismos de ação de drogas que resultam em alterações fetais decorrentes da exposição de mulheres grávidas no terço final da gestação.

O período gestacional de roedores é de 22 dias, que é equivalente a somente aos dois primeiros trimestres gestacionais em humanos. No entanto, muitos eventos de desenvolvimento críticos ocorrem neste período, como o aparecimento de nAChRs (Naeff et al., 1992), o nascimento da maioria dos grupos de células neuronais e o início da sinaptogênese (Bayer et al., 1993). As primeiras duas semanas pós-natais do desenvolvimento neuronal de ratos ou camundongos são um período crítico para neurogênese no hipocampo e cerebelo, e sinaptogênese no córtex (Bayer et al., 1993). Este é também o momento de entrada de fibras colinérgicas no córtex (Bayer et al., 1993), isto enquanto dois tipos principais de nAChRs de alta afinidade, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$, atingem picos em várias regiões cerebrais (Broide et al., 1995; Zhang et al., 1998).

Devido a isto, alguns grupos de pesquisa têm optado por administrar drogas em ambos os períodos, gestacional e neonatal, em um esforço de realizar uma exposição que se assemelhe ao período inteiro de gravidez humana (por exemplo: Chen et al., 2005). Em contrapartida, alguns poucos estudos investigaram efeitos da exposição durante o período pós-natal recente (por exemplo, Aramakis et al., 2000) em um esforço para examinar os efeitos da droga sobre o desenvolvimento do sistema nervoso sem ser potencialmente confundido com os efeitos devido à alterações durante a organização cerebral precoce.

Justificativas Para os Estudos

Esta tese de doutorado foi dividida em 2 estudos cujo objetivo comum foi a avaliação da susceptibilidade tardia associada à exposição precoce a drogas de abuso. Como detalhado na sessão de Métodos, o Estudo 1 foi realizado no Laboratório de Neurofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, enquanto que o Estudo 2 foi realizado no Departamento de Farmacologia e Farmacoterapia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Copenhague, como parte do Doutorado Sanduiche, pelo Programa Ciências Sem Fronteiras.

Estudo 1

Apesar da extensa descrição dos efeitos da nicotina do sistema nervoso central de animais experimentais, há poucos estudos em modelos animais com foco nos efeitos da fumaça de cigarros. Uma vez que mais de 4500 substâncias foram identificados na fumaça do tabaco e que há evidências componentes além da nicotina desempenham um papel importante nos efeitos do tabaco no sistema nervoso central (Abreu Villaça et al, 2010a; Bruijnzeel, 2012; Rose, 2006;. Villégier et al, 2010), uma abordagem alternativa para investigar mais de perto os efeitos do tabagismo seria a utilização de modelos animais de exposição à fumaça do tabaco.

Só recentemente os efeitos da combinação entre a nicotina e o etanol e fumaça de cigarro e etanol começaram a ser descritos, sendo que a grande maioria dos estudos têm investigado os efeitos da co-exposição durante a adolescência (Abreu-Villaça et al. 2007, 2008; 2013a; 2013b; Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009; Oliveira-da-Silva et al., 2009, 2010) ou durante a gestação de roedores (Basta et al., 2000; Matta e Elberger, 2007; McMurray et al., 2008). Desta forma, não há estudos que investiguem os efeitos da combinação entre fumaça de cigarro e do álcool precocemente durante o desenvolvimento, principalmente que estejam voltados para a verificação de uma aumentada susceptibilidade a estas drogas durante a adolescência e a idade adulta. Os fatores que podem levar ao consumo de drogas de abuso são difíceis de controlar em estudos epidemiológicos, no entanto, em modelos animais que imitam a exposição materna durante a gravidez tais parâmetros podem ser minimizados (Chistyakov et al., 2010; Klein et al., 2003; Levin et al., 2006).

Tendo em vista que: 1º) o tabaco é uma das drogas mais consumidas no mundo, 2º) que mais de 90% dos fumantes iniciam o hábito durante a adolescência (Pierce e Gilpin, 1996) e que 3º) em comparação aos adultos, os adolescentes apresentam maior dificuldade de abandonar o vício (Chen e Millar, 1998) e apresentam sintomas de dependência mais rápido (DiFranza et al., 2002), neste estudo, submetemos camundongos durante o período que corresponde à gestação de humanos à fumaça de cigarro e/ou etanol visando investigar se a estas drogas de abuso, separadamente ou quando combinadas, programam maior susceptibilidade aos efeitos da nicotina (o principal componente psicoativo do tabaco) durante a adolescência ou idade adulta de camundongos.

Estudo 2

Uma hipótese para explicar a alta propensão para o vício é que os núcleos relacionados com toxicodependência do cérebro de pessoas expostas em útero podem ter sofrido alterações de neuroplasticidade induzida por drogas, resultando em mudanças na capacidade de resposta a exposições subseqüentes a drogas de abuso.

Muitos estudos vêm investigando efeitos de drogas de abuso na via mesocorticolímbica, principalmente em estruturas como o VTA, NAcc e córtex pré-frontal. Interessantemente, uma área recentemente reconhecida capaz de desempenhar um papel significativo nos comportamentos associados na dependência de drogas é o LDT (Lodge and Grace 2006; Maskos 2008; Maskos et al 2005). Contudo, os efeitos da exposição precoce a nicotina neste núcleo e a resposta dos neurônios do LDT a uma exposição subsequente ao etanol não são conhecidas.

Assim, neste estudo, submetemos camundongos fêmeas grávidas à nicotina visando investigar se a esta droga de abuso induz alterações eletrofisiológicas nos neurônios do LDT da prole, levando a alterações na capacidade de resposta celular e sináptica destas células quando expostas ao etanol no período pós-natal.

1 OBJETIVOS

Com isto, o presente estudo teve como objetivo investigar se a susceptibilidade à nicotina e/ou ao etanol é afetada pela exposição à nicotina isolada, a fumaça de cigarro e ao etanol durante o período gestacional. Mais diretamente, iremos investigar as alterações comportamentais (investigação realizada no estudo 1) e eletrofisiológicas (investigação realizada no estudo 2) no período pós-natal de camundongos que tenham sido expostos a estas drogas no período gestacional.

Este trabalho foi realizado em 2 estudos separadamente:

Estudo 1:

Objetivo 1: Investigar os efeitos da combinação entre tabaco (fumaça de cigarro) e etanol durante a gestação de camundongos, avaliando a susceptibilidade a uma segunda exposição à nicotina durante a adolescência ou na idade adulta através de 3 testes comportamentais:

- Teste de campo aberto (CA)
- Teste da Preferencia Pela Nicotina (PPN)
- Teste da Preferencia Condicionada por Lugar (CPP)

Estudo 2:

Objetivo 1: Determinar as ações eletrofisiológicas do álcool sobre os neurônios-identificados fenotipicamente da LDT

Objetivo 2: Elucidar se a exposição pré-natal à nicotina induz alterações celulares e moleculares persistentes em neurônios dentro do LDT levando a alteração na capacidade de resposta celular e sináptica destas células a álcool.

2 METODOLOGIA

Os experimentos que resultaram nesta tese de Doutorado foram realizados em 2 etapas. A primeira foi realizada no Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob orientação da professora Yael de Abreu Villça, e consistiu em avaliações comportamentais dos efeitos imediatos, de condicionamento e de preferência de uma reexposição à nicotina, após tratamento durante o desenvolvimento com nicotina e etanol. A segunda etapa foi realizada no Departamento de Farmacologia e Farmacoterapia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Copenhague, como parte do Doutorado Sanduiche, pelo Programa Ciências Sem Fronteiras, sob orientação da professora Kristi Anne Kolmeier, e consistiu em avaliações eletrofisiológicas funcionais de células neuronais do núcleo tegumental laterodorsal (LDT) de fatias cerebrais expostas ao etanol, utilizando a técnica de registro eletrofisiológico de uma única célula ("whole cell patch clamping"), após tratamento dos animais, também durante o desenvolvimento, com nicotina. Ambos os estudos tiveram como finalidade principal a avaliação da susceptibilidade aos efeitos da nicotina e do etanol durante o desenvolvimento.

2.1 Etapa 1 _ Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Estudos Comportamentais

Todos os experimentos descritos a seguir estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de cuidados e uso de animais de laboratório adotado e promulgado pelos Institutos Nacionais de Saúde tendo sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética para Cuidados e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/031/2012). Camundongos Suíços são criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro com um ciclo diário de 12 horas de claro escuro (escuro a partir das 13 horas), temperatura controlada e mantida em torno de 21° C, com livre acesso à água e ração (Nuvlab, Brasil).

2.1.1 Exposição à fumaça de cigarro

Neste estudo, a partir de uma máquina de queima de cigarro (Figura 1) da empresa Teague Enterprises, com sede em Davis, CA, EUA.

A porção superior da máquina (Figura 1-a) tem como função principal a queima de cigarros e então distribuição da fumaça oriunda para as câmaras abaixo. Inicialmente, os cigarros posicionados manualmente descem por uma esteira (b), onde ao final se localiza uma porção metálica a partir da qual cada cigarro é empurrado por um pistão a cada oito minutos e quarenta segundos. Após o cigarro estar posicionado adjacente a um disco (c) onde fica ao longo do tempo em que será queimado, esse disco gira de modo a deixar o cigarro posicionado verticalmente. Ao lado oposto há uma resistência metálica (d), pela qual passa uma corrente elétrica no momento em que o cigarro fica na posição correspondente à da própria resistência. A corrente então faz a resistência se aquecer, gerando calor o suficiente para acender o cigarro. O disco que prende o cigarro então gira 360 graus após alguns segundos, em um momento em que a resistência se aquece de novo, para garantir que o cigarro seja aceso. O disco então gira novamente, 90 graus, fazendo que com o cigarro então saia da posição paralela à resistência e se aloque em uma posição de repouso, onde fica até o final de sua queima.

Durante estes 8 minutos e quarenta segundos de queima os cigarros geram 2 tipos de fumaça. Um dos tipos, chamada de fumaça principal (*mainstream*), é gerada a partir da sucção da fumaça, a qual passa pelo filtro do cigarro. Para que a principal ocorra, a cada minuto, uma pequena bomba de sucção simula uma tragada do cigarro, de forma que cada cigarro sofre este processo nove vezes. Ao final destes ciclos, o disco gira mais uma vez, até a posição final, onde um pistão (e) ejeta o cigarro e então o ciclo recomeça. O outro tipo de fumaça é chamado de secundária (*sidestream*), oriunda da queima e dissipação da fumaça. A fumaça secundária dissipa-se para dentro da pequena câmara onde se localiza a resistência. Ambas as fumaças são então sugadas de forma contínua para uma câmara de mistura (f). A partir desta câmara de mistura, a fumaça gerada é então sugada para as câmaras onde os animais experimentais permanecem durante o período de exposição.

A porção inferior da máquina de queima de cigarros é constituída de duas câmaras, cada uma dividida em uma porção superior e uma porção inferior. Essas câmaras têm como função a exposição dos animais experimentais à fumaça de cigarros, oriunda da porção superior do aparelho. A fumaça então vem da porção superior a partir de tubos, passa às

câmaras de exposição e é continuamente eliminada para o exterior do prédio também por um sistema de tubos. Todo o fluxo da fumaça desde seu local de geração até o meio externo é determinado por um exaustor que funciona de forma contínua durante o período de exposição. Desta forma, fumaça à qual os animais são expostos é continuamente renovada por esse sistema de exaustão. A pressão interna na câmara, assim como o fluxo, é regulada por uma válvula na porção anterior do aparelho, que é associada à um barômetro, cujo valor é constantemente mantido em 0,4 polegadas de coluna d'água. As câmaras são vedadas com portas de plástico, e as suas entradas são vedadas com uma borracha, de modo a impedir a entrada ou saída de ar de fora do sistema.

Figura 1 - Máquina de queima de cigarro



Legenda: (a) Porção superior, responsável pela geração e distribuição da fumaça para a exposição; (b) Esteira; (c) Disco onde os cigarros a serem queimados ficam posicionados; (d) Resistência; (e) Pistão ejetor; (f) Câmara de mistura.

Fonte: O autor, 2013.

Visando a exposição à fumaça de cigarro desde o início da gestação, os animais foram levados para a máquina de fumaça já a partir do primeiro dia de acasalamento.

Os animais progenitores em gaiolas padrão com 1 macho e 2 fêmeas foram expostos a fumaça gerada a partir da queima de cigarros do tipo 3R4F, específicos para pesquisa, contendo 0,7 mg de nicotina produzidos na *Kentucky University, Louisville, KY, USA*, por um período de 8h por dia. Uma vez identificada a gravidez em alguma das fêmeas, esta era isolada em outra gaiola e permanecia sendo levada à máquina até que seus filhotes nascessem e atingissem a idade de PN10.

Animais controle sofreram os mesmos procedimentos sendo que estes foram confinados à uma câmara semelhante aos tratados com fumaça de cigarro, por onde passava somente ar corrente.

2.1.2 Exposição ao álcool

A partir do segundo dia de vida, em PN2, os filhotes foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com álcool etílico diluído em salina (2mg/kg, 10%, v/v,) ou somente salina, no caso dos animais controle, em dias alternados, ou seja, em PN2, PN4, PN6, PN8 e PN10, totalizando ao final da exposição ao etanol 5 injeções. A dose escolhida foi uma dose moderada a ser administrada nos filhotes em dias alternados, visando uma aproximação de um padrão intermitente de exposição decorrente da utilização de bebidas alcoólicas por parte das mães.

Desta forma, o estudo comportamental completo do impacto da exposição à fumaça de cigarro e ao etanol requereu 4 grupos experimentais: SMK+ETOH (exposto à fumaça de cigarro e injetado etanol i.p), SMK (exposto à fumaça de cigarro e injetado salina i.p), ETOH (exposto ao ar corrente e injetado com etanol i.p) e VEH (exposto ao ar corrente e injetado com salina i.p). Com este desenho, fomos capazes de identificar os efeitos isolados da fumaça de cigarro, os efeitos isolados do etanol e os efeitos da exposição a ambas as drogas na prole.

O controle do peso dos neonatos foi realizado a cada dois dias, juntamente com a administração das injeções de etanol. O desmame ocorreu em PN28, quando os animais foram separados por sexo e mantidos em grupo da mesma ninhada até PN30 (início do período da adolescência) ou PN90 (idade adulta). Nestas idades, os animais machos e fêmeas de cada ninhada foram semi-randomicamente distribuídos entre três testes comportamentais. Assim,

as avaliações comportamentais descritas abaixo envolveram testes nas 2 idades indicadas acima, com 10 ninhadas em cada grupo experimental: 4 grupos experimentais x 2 idades x $n=10$ = 80 ninhadas. Para minimizar a influência do tamanho da ninhada no efeito de programação, somente utilizamos mães que geraram 8 a 12 filhotes.

2.1.3 Testes comportamentais

2.1.3.1 Teste do Campo Aberto (CA)

O teste do campo aberto foi realizado em um monitor de atividade (EP-149, Insight, SP), que consiste em uma caixa de acrílico ($46.5 \times 46.5 \times 35$ cm) equipada com duas barras paralelas contendo 16 pares de emissores e sensores de infravermelho alinhados e posicionados a 1,5 cm do chão (Figura 2). Imediatamente antes da realização do teste, os animais recebem uma injeção de nicotina (*free base*, Sigma, USA) (0,5 mg/kg, i.p.) ou salina, para os animais controle. O teste tem duração de 10 minutos. Avaliamos os escores de tempo no centro (utilizado como um indicador de ansiedade) e a distância percorrida (utilizado como um indicador de atividade locomotora). A distância percorrida pelos animais foi registrada em intervalos de 1 minuto durante o teste e medida em centímetros. Estas variáveis são calculadas automaticamente por um computador conectado ao Monitor de Atividade a partir da contagem do número de interrupções dos feixes de infravermelho.

Figura 2 - Monitor de atividade para o Teste do Campo Aberto (CA)



Legenda: Utilizado para a avaliação de tempo no centro e de distância percorrida.
Fonte: O autor, 2013.

2.1.3.2 Teste de Preferencia Pela Nicotina (PPN)

No dia anterior ao início do teste, as garrafas de água foram retiradas das gaiolas, privando o animal de água por 24h. Então, neste teste nós oferecemos ao animal duas pipetas, uma contendo uma solução de nicotina e outra contendo somente água por um período de 2h durante o dia, sendo retiradas ao final do período e o animal mantido em privação de líquidos até o dia seguinte. A privação e subsequente oferta de 2 opções de líquido, uma contendo água filtrada e outra contendo solução de nicotina, se repete por 12 dias (Figura 3).

Durante os seis primeiros dias foram utilizadas soluções de 10 µg/mL de nicotina (*free base*, Sigma, USA), após estes dias, a concentração de nicotina foi sendo reduzida gradualmente, este procedimento é conhecido como *Fading Study*. Nos 7º e 8º dias a concentração foi de 7 mg/mL, nos 9º e 10º dias 5 mg/mL e nos 11º e 12º dias utilizamos 3mg/mL. O objetivo do *Fading Study* é observar se os animais aumentavam o consumo da solução com nicotina a fim de manter estável a dose ingerida da droga.

Para evitar uma preferência por uma das duas soluções devido a preferência do animal por um dos lados da caixa, a cada 3 dias a posição das pipetas era trocada. A aferição se fez subtraindo o volume final encontrado após 2h pelo inicial colocado, que era sempre de 20ml.

Figura 3 - Gaiola preparada para o Teste de Preferencia Pela Nicotina (PPN)



Legenda: Utilizada para avaliação de preferencia pela nicotina quando há livre escolha.
Fonte: O autor, 2013

2.1.3.3 Teste da Preferencia Condicionada Por Lugar (CPP)

O CPP envolve o aprendizado pavloviano e consiste em um modelo extensamente aceito e utilizado para estudar propriedades de recompensa de uma droga de abuso em modelos animais. Neste teste os animais foram condicionados para associar o ambiente com a droga. O condicionamento foi aceito quando o animal despendeu mais tempo no ambiente onde ele recebeu a droga, o que reflete a associação das propriedades de recompensa da droga com o ambiente.

O equipamento usado para a realização do CPP consiste em uma caixa com três câmaras: a câmara central é considerada neutra, usada como “start box”; uma das outras câmaras possui a parede com listras horizontais e piso quadriculado, enquanto que a terceira possui parede com listras verticais e chão em chapa de aço inox vazado (Figura 4).

Figura 4 – Caixa para o Teste da Preferencia Condicionada Por Lugar (CPP)



Legenda: Utilizado para avaliação das propriedades de recompensa de uma droga. (a) Câmara Neutra (b) Câmara com parede com listras verticais e chão em chapa de aço inox vazada (c) Câmaras com a parede com listras horizontais e piso quadriculado.

Fonte: O autor, 2013.

O protocolo consiste de 4 momentos:

Primeiro momento; habituação - Esta etapa consistiu na habituação do animal às injeções (i.p.). Assim, nos dois primeiros dias todos os animais foram submetidos a uma única injeção de salina por dia.

Segundo momento; pré-teste - No terceiro dia, os animais receberam injeções de salina e foram colocados na câmara neutra com as portas de acesso para as outras duas câmaras abertas. Os animais tinham 15 minutos para explorar livremente o aparelho. Esta etapa foi filmada e o tempo que o animal permaneceu em cada uma das câmaras foi contabilizado. A câmara onde o animal permanecia por mais tempo foi assumida como sendo a câmara de preferência do animal.

Terceiro momento; condicionamento - Nesta terceira etapa os animais foram condicionados durante oito dias. Foram realizadas duas sessões diárias de condicionamento, uma pela manhã e outra cinco horas após a primeira. Inicialmente, os animais foram separados em Controle e Condicionados. Para os animais Condicionados, a nicotina foi pareada com o lado não preferido do animal, ou seja, a droga foi administrada, durante os dias de condicionamento, no lado oposto ao que ele permaneceu por mais tempo durante o pré-teste (modelo “biased”). Dessa forma, em uma das sessões diárias (a primeira ou a segunda delas), o animal recebeu a injeção de nicotina (*free base*, Sigma, USA) (0,5mg/Kg, i.p.) e permaneceu confinado no lado não-preferido durante 15 minutos, sem acesso às outras

câmaras. Na outra sessão, o animal recebeu solução salina no lado preferido. Os animais Controle receberam injeções de salina em ambos as câmaras, em ambas as sessões e em todos os dias de condicionamento.

Quarto momento; teste - No dia do teste, a preferência do animal pelo o lado pareado com a nicotina foi testada. O animal não recebeu nenhuma injeção e foi colocado na câmara neutra podendo explorar livremente as 3 câmaras durante 15 minutos. Se o tempo gasto no compartimento onde ele recebeu a droga (na câmara não-preferida) foi maior que o tempo que ele permaneceu no compartimento que foi preferido por ele no pré-teste, assume-se que o animal associou as propriedades de recompensa da droga ao ambiente em que ela foi administrada.

A análise dos dados foi feita pela comparação entre o tempo que o animal passou dentro da câmara tida como a não-preferida no pré-teste e no teste pós-condicionamento (pré e pós condicionamento). Além disso, foi realizado um índice de condicionamento que indica o percentual de aumento no tempo de permanência na câmara não preferida no teste pós-condicionamento. Se esta medida for positiva, podemos dizer que o animal condicionou, associando aquele lado à droga.

$$\text{Índice} = (\%T \text{ não preferido pós} - \%T \text{ não preferido pré}) / \text{total} * 100$$

Onde:

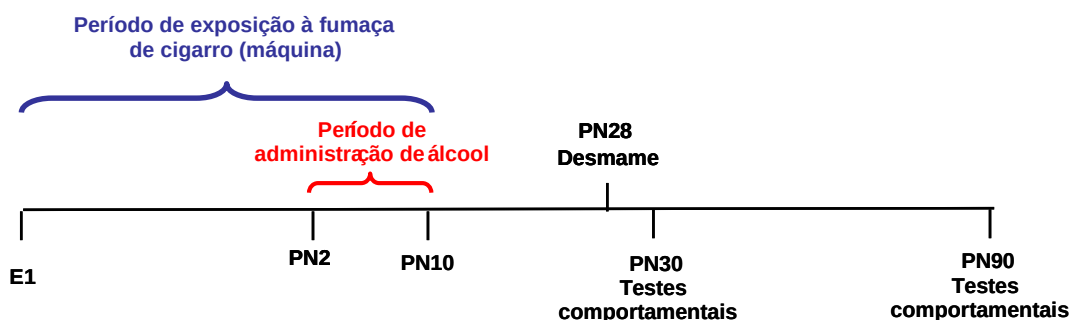
- %T não preferido pós = percentual de tempo gasto na câmara não preferida após o condicionamento;

- %T não preferido pré = percentual de tempo gasto na câmara não preferida antes do condicionamento;

- total = soma dos percentuais anteriores

Em resumo, a figura 5 apresenta a linha temporal dos principais procedimentos realizados neste desenho experimental.

Figura 5 - Linha temporal do modelo experimental utilizado



Legenda: E = Dia Embrionário. PN = Dia Pós Natal
 Fonte: O autor, 2014.

2.1.4 Análise dos dados

A análise de resultados foram realizadas utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM, USA). Foram realizadas análises de variancia (ANOVAs), seguidas do teste poshoc Fisher's Protected Least Significant Difference (FPLSD). Quando havia medidas repetidas obtidas a partir do mesmo animal, eram realizadas análises de variancia para medidas repetidas (rANOVAs), também segidas pelo FPLSD. Para a análise condicionamento ao ambiente no CPP, também foram feitos testes T pareados como análise posterior da rANOVA.

2.2 **Etapa 2 _ Universidade de Copenhagen – Estudos Eletrofisiológicos**

2.2.1 Exposição dos animais à nicotina

Em uma gaiola de biotério contendo material pra nidificação (pequenas tiras de tecido de algodão) e enriquecimento ambiental (pequena caixa feita de acrílico vermelho), fêmeas NMRI (Taconic, Dinamarca ou Harland, Holanda) foram alocadas individualmente e tiveram acesso livre à ração (Altromin, Alemanha) e água. Os animais foram mantidos em um ciclo de

12 horas de claro e escuro, a temperatura e a umidade foram mantidas em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e 36-58%, respectivamente.

A solução de nicotina era então preparada a uma concentração inicial de $50\mu\text{g/ml}$ a uma quantidade de 200ml (Nicotine Hydrogen tartrate salt, Sigma, USA) com o sabor suavizado com a adição de 2% de sacarina (Saccharin Sodium salt hydrate, Sigma, USA) com o propósito de não inibir o consumo (Matta et al., 2007; Nesil et al., 2011; Ribeiro-Carvalho et al., 2011; Manhães et al., 2008), sendo substituída duas vezes por semana para que os animais sempre tivessem acesso a solução fresca. A concentração era aumentada a cada duas vezes que a água era entregue aos animais, ou seja, a cada semana, indo de $50\mu\text{g/ml}$ para $100\mu\text{g/ml}$, na primeira semana, $200\mu\text{g/ml}$ na segunda até atingir a maior concentração, $300\mu\text{g/ml}$. Os animais controle (animais SAC; por terem recebido sacarina no período pré-natal) receberam apenas água contendo 2% de sacarina. O valor de pH da solução de nicotina era mais ácido que a solução de sacarina. Para que não houvesse disparidade no consumo devido ao paladar, ambas as soluções tinham o pH ajustado (aproximadamente 7.8) com hidróxido de sódio.

A quantidade de nicotina consumida oralmente é espécie-dependente (Robinson et al., 1996) e, enquanto algumas espécies podem tolerar concentrações de nicotina acima de $200\text{--}500\mu\text{g/ml}$ sem decair o consumo de água, outras espécies se mostram mais sensíveis (Matta et al., 2007). Embora camundongos sejam muito tolerantes a nicotina ingerida, e nas concentrações que foram utilizadas neste trabalho, como demonstram estudos anteriores (Christensen et al., 2014), o esperado é que o consumo de água contendo nicotina seja inferior quando comparado com o consumo daqueles que receberam somente água.

No momento em que a maior concentração era atingida, um macho era introduzido em cada gaiola e mantido nesta até que a fêmea parecesse estar grávida, então era removido, a fêmea era realocada em uma gaiola maior e a solução de nicotina era mantida na concentração de $300\mu\text{g/ml}$ até o dia do nascimento dos filhotes (animais EPN, por terem sido expostos a nicotina no período pré-natal), quando então era trocado por água normal.

Entre os grupos não houve diferença no tamanho da ninhada, no peso dos animais (peso em PN2; sacarina $2,15 \pm 0,14\text{g}$, $n=4$ ninhadas; nicotina $2,15 \pm 0,15\text{g}$, $n=5$ ninhadas; teste T, two way $p>0.05$) ou até mesmo na aparência dos filhotes, o que sugere que o cuidado maternal foi similar entre as mães nos tratamentos. Embora a adoção cruzada de filhotes (*cross-fostering*) seja comumente utilizada em modelos de exposição pré-natal à nicotina com o propósito de eliminar comportamentos induzidos pela nicotina no cuidado maternal, este procedimento não foi utilizado neste estudo uma vez que os cuidados maternos não

aparentaram ser diferentes entre os grupos tratados e controles. E também, a adoção cruzada de filhotes em por si só aparentemente parece influenciar a liberação de dopamina estimulada pela nicotina no núcleo acumbente (Kane et al., 2004).

2.2.2 Preparação do tecido

Os animais foram conduzidos do biotério até o laboratório em idades que variavam entre PN9 e PN20, foram então anestesiados rapidamente, usando isoflurane. Uma vez que a anestesia fizesse efeito, o animal era decapitado. Um corte longitudinal era feito com um bisturi na porção superior do crânio do animal para que se pudesse ter acesso a caixa craniana que também sofreu um corte longitudinal, desta vez com a ajuda de uma tesoura, e suas partes rebatidas com uma pinça. Deste momento em diante o trabalho era realizado com o crânio do animal imerso em uma Placa de Petri contendo fluido cérebro espinhal artificial oxigenado e semicongelado (ACSF) contendo: NaCl 124,03mM, KCl 4,99mM, Na₂HPO₄ 1,2mM, CaCl₂ 2,69mM, MgSO₄ (anidro) 1,2mM, Dextrose 9,99mM, NaHCO₃ 25,95mM; oxigenado com 95% de oxigênio e 5% de carbono. Uma vez o cérebro tendo sido exposto, um corte coronal com um bisturi levemente inclinado (cerca de 2°) era feito. A porção caudal era gentilmente removida. Nesta porção está a região do cérebro contendo o núcleo tegumental laterodorsal (sigla LDT quando abreviado em inglês).

Deste momento até o final de todo o procedimento de preparação do tecido este fluido era mantido em um estado de semi-congelamento com o propósito de reduzir o metabolismo e aumentar assim a viabilidade celular. Adicionalmente, o refrigeramento melhora a consistência do tecido para o corte (Edwards et al., 1989; Ivanov e Zilberter 2011).

O procedimento de corte das fatias de cérebro contendo LDT era realizado após a montagem desta porção de cérebro em uma cuba de corte de em um vibrátomo Leica (VT1200S) o qual foi checado anteriormente afim de melhorar a qualidade do corte e evitar vibrações verticais da lâmina (Geiger et al., 2002). A série de cortes coronais era realizado a uma velocidade de 0,05 mm/s e com espessura de 250nm. Após a realização do corte, o tecido foi incubado, ainda em ACSF oxigenado, por 15 minutos desta vez a 37° célsius, este procedimento tem como finalidade matar células que eventualmente tenham sido fragilizadas pelo procedimento, e então, a cuba de ACSF contendo os cortes era posta na bancada por 1 hora a temperatura ambiente para que o tecido se estabilizasse antes dos procedimentos e

registro comecem. Após uma hora de incubação na bancada, o tecido era levado para uma câmara de registros acoplada ao microscópio por onde fluido ACSF oxigenado era continuamente bombeado até o final do período de registro para a manutenção da integridade do tecido.

Figura 6 - Cuba de corte de em um vibrátomo Leica (VT1200S)



Legenda: No centro podemos observar a região caudal do cérebro segura por um bloco de ágar para maior estabilidade (a); O corte está sendo feito em ACSF semicongelado e constantemente oxigenado (b).

Fonte: O autor, 2014.

2.2.3 Registro Eletrofisiológico de uma Única Célula (*Whole Cell Patch Clamping*)

Em “whole cell voltage clamp” o potencial de membrana fica fixo a um potencial escolhido pelo experimentador (chamado de potencial de comando). Se o potencial de membrana mensurado desviar do potencial comandado, uma corrente compensatória é injetada na célula a fim de corrigir e fazer com que o potencial de membrana atinja o potencial comandado. Alterações na corrente injetada, no entanto, representam o fluxo de íons através da membrana celular.

Em outro método de registro chamado de “whole-cell current clamp”, uma corrente fixa é continuamente injetada na célula e alterações no potencial de membrana são mensurados. Ambos os métodos de registro foram usados para examinar propriedades intrínsecas da membrana e comunicações sinápticas de células presentes no LDT.

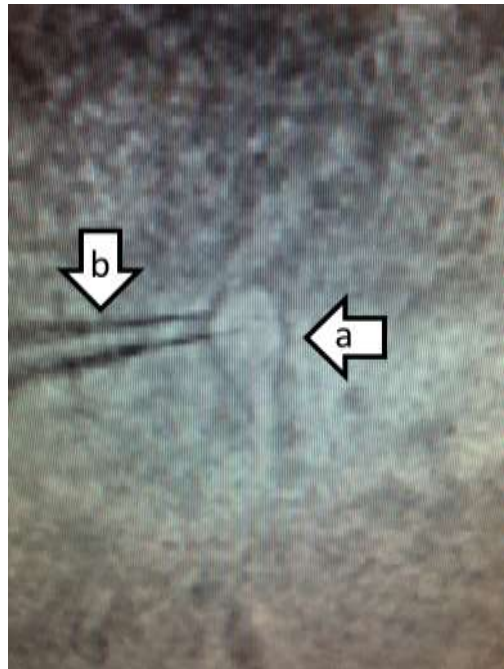
Finas pipetas de vidro borossilicado com uma resistência entre 3 e 7 M Ω foram fabricadas em um puchador horizontal Sutter P-97. Estas pipetas foram preenchidas com solução de patch, usada para os registros eletrofisiológicos de uma única célula, a solução preparada para este trabalho foi composta de: K-gluconate 144mM, KCl 2mM, HEPES 10mM, EGTA (ácido tetraacetic) 0,2mM, Mg-ATP 5mM, Na-GTP 0,3mM. A composição desta solução, como será detalhado mais abaixo, permitiu registros simultâneos de ambas as correntes, tanto correntes excitatórias (defleções de correntes para baixo – Correntes excitatórias pós-sinápticas (EPSC)), quanto correntes inibitórias (defleções de correntes para cima – Correntes inibitórias pós-sinápticas (IPSC)) o que possibilita uma investigação funcional em presença de ambos os inputs.

Logo em seguida as pipetas eram submergidas na câmara de registro, um pequeno compartimento acoplado ao microscópio que permite submergir o tecido em ACSF oxigenado corrente, o fluxo deste é contínuo para manter a viabilidade das células durante o período de registro eletrofisiológico. Dentro desta mesma câmara se encontra outro eletrodo que irá fechar o circuito com o que está na pipeta. Uma pequena pressão de ar foi aplicada na pipeta afim de provocar um pequeno fluxo de fluido para fora da pipeta. Este fluxo serve inicialmente para prevenir que partículas venham a aderir na abertura da pipeta, que podem obstruir a mesma, e também tem a finalidade de limpar a superfície do neurônio selecionado para o registro, que melhora a ligação entre a superfície celular e a pipeta.

Uma vez havendo contato entre a superfície da célula e a pipeta, a pressão é retirada e uma pressão contrária começa a ser aplicada, uma pressão de sucção para que o contato entre superfície celular e pipeta seja o maior possível, ficando praticamente selado. A resistência mensurada neste selo tem de ficar acima de um giga ohm (gigaseal). A formação de uma alta resistência de selo entre a pipeta e a superfície celular diminui a dispeção de corrente uma vez que o "whole cell patch" tenha sido executado, reduzindo assim flutuações na corrente durante o processo de registro.

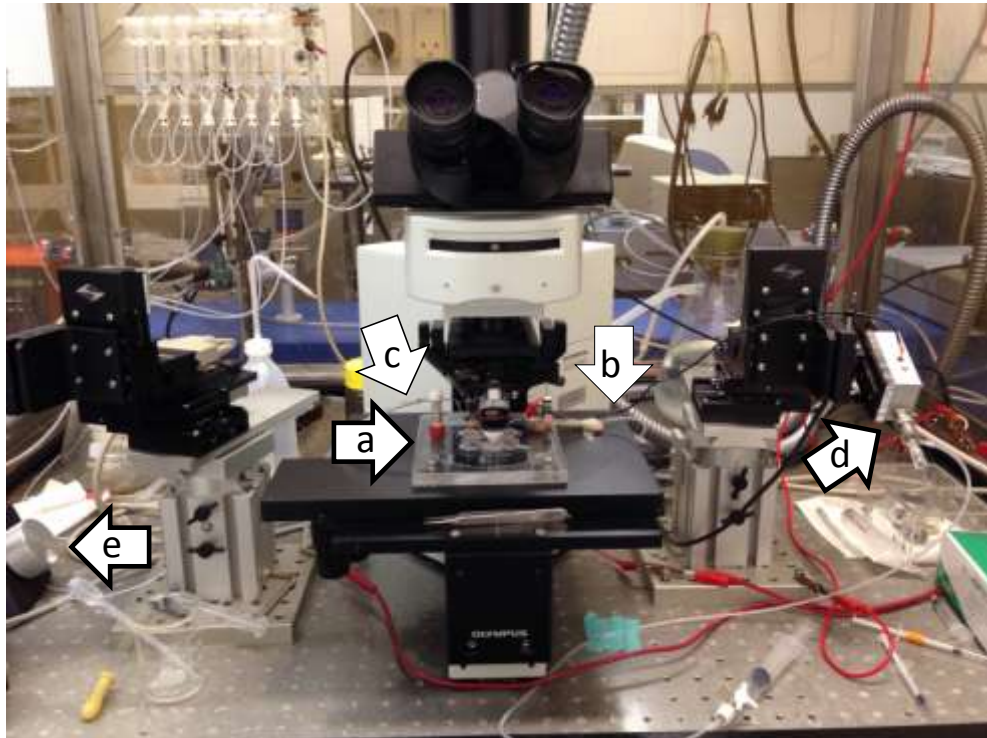
Depois da formação de um gigaseal estável, era aplicada uma corrente para manter o potencial de membrana em -60mV e então a membrana da célula era rompida por uma rápida e forte sucção, criando assim um circuito elétrico entre o eletrodo na pipeta (o eletrodo é formado por um fio de prata clorada) e o citoplasma da célula. O potencial da célula pode então ser mensurado quando comparado com um eletrodo extracelular contido na câmara de registro.

Figura 7 – Micrografia da fatia de cérebro (aumento de 100x0)



Legenda: Célula (a) segura por uma pipeta de vidro borosilicado (b).
 Fonte: O autor, 2014.

Figura 8 - Gaiola de Faraday.



Legenda: Nesta figura observamos um microscópio com a cuba de registros acoplada (a); tubo de aplicação de ASCF (b); tubo de sucção do ACSF (c); braço robótico articulado de encaixe da pipeta (d); centro de controle do braço articulado (e).
 Fonte: O autor, 2014.

Ao introduzir a pipeta de registro na câmara, é criado um único potencial entre as interfaces de duas soluções diferentes, o ACSF presente na câmara e a solução de patch contida na micro-pipeta. Este potencial de junção foi mensurado em aproximadamente 15mV, no entanto, não foram feitas correções para este potencial. Adicionalmente, quando a pipeta é abaixada na solução da câmara, a superfície do vidro atua como um capacitor devido as diferenças de potenciais entre a parte interna, contendo a solução de patch, e a parte externa, contendo a solução de ACSF. Antes que as mudanças de potencial possam ocorrer, o capacitor precisa ser carregado afim de retardar qualquer alteração e a influência da capacitância pode por fim ser minimizada. Pela manutenção de um baixo nível de fluido em ambos os lados do vidro da pipeta, a capacitância da pipeta foi diminuída a uma capacitância proporcional a superfície da área do capacitor. A capacitância da pipeta não precisou ser então compensada.

A capacitância da membrana é mensurada a partir da diferença de carga entre o interior da célula e o meio extracelular, e foi compensada usando um compensador de capacitância automático. Discrepâncias entre o potencial de membrana mensurado e o potencial de membrana atual podem surgir usando esta técnica uma vez que a corrente injetada pode encontrar resistências que irão causar quedas de voltagem, isto antes de atingir a célula. Esta resistência consiste na resistência da pipeta e na resistência de acesso (resistência que ocorre na exata junção entre a pipeta e a célula) que combinadas são referidas como a resistência de série. Para atingir uma melhor compensação de potencial de membrana automática, a compensação da resistência de série foi realizada. A compensação completa desta resistência não é possível uma vez que isto iria levar oscilações para a célula, no entanto, compensações de 70% a 80% podem ser usualmente obtidas sem nenhum problema. Alterações na resistência de série durante o processo de registro indicam que a resistência de acesso está mudando, provavelmente através da re-organização da membrana no ponto de ruptura, que pode levar ao selamento deste ponto de acesso, que poderia estar aumentando a resistência. Esta ruptura pode ser reaberta aplicando mais força de sucção, no entanto, em circunstâncias onde isto não foi possível e a resistência de série permaneceu aumentando durante o registro, as células foram então descartadas. Registros onde a resistência de série excedeu 30M Ω também foram descartadas.

Registros no qual a corrente que injetada pelo para que a voltagem da membrana permaneça estável, corrente de fixação, excederam 50pA também foram rejeitadas uma vez que isto indica que o contato entre a célula e a pipeta não está selado o suficiente, no entanto

em algumas células onde os registros foram continuamente feitos por mais de uma hora, correntes de fixação acima de 50pA foram aceitas.

Depois que a membrana celular era rompida, a solução de patch preenchia o interior da célula através de difusão passiva. Através disto o controle do meio intracelular pode ser atingido e utilizado para manipular a composição iônica da célula e examinar os canais iônicos sob diferentes condições.

Para possibilitar uma melhor detecção de IPSCs ou IPSCm, a concentração de cloro usada na solução de patch foi menor que a normalmente encontrada intracelularmente. Esta alteração no gradiente químico de cloro produziu um potencial negativo reverso para este íon, o que aumenta o influxo de cloro em resposta a uma abertura de canais permeáveis à este íon em decorrência a um aumento de corrente inibitória de cloro.

Para ajudar a discernir ainda melhor as ocorrências dos eventos excitatórios e inibitório os registros foram feitos na presença de inibidores farmacológicos aplicados juntamente com a perfusão de ACSF. Para a verificação de correntes excitatórias foram utilizados Estricnina 2,5 μ M (ST), bloqueador seletivo para receptores de Glicina, e Gabazina 20 μ M (SR-95531), bloqueador seletivo de GABA, utilizados para o bloqueio de neurotransmissão inibitória, mantendo as neurotransmissões excitatórias.

Para a verificação de eventos inibitórios foram utilizados 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione 15 μ M (DNQX), bloqueador para receptores AMPA e Kainato, e ácido D(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic a 50 μ M (AP5), bloqueador seletivo de receptores NMDA, utilizados para o bloqueio de neurotransmissão excitatória, mantendo as neurotransmissões inibitórias.

Para verificação de eventos onde a geração de potencial de ação havia sido bloqueada, pós-sinápticos em miniatura (mEPSC ou mIPSC), alguns registros foram feitos em presença de tetrodotoxina 500nM (TTX), adicionada a perfusão de ACSF, evitando assim geração de potenciais de ação e inibindo a comunicação celular por este ser um bloqueador de canais de sódio. Desta forma, potenciais de ação decorrentes de comunicação neuronal eram bloqueados e os resultados observados eram decorrentes da ação do álcool diretamente na célula avaliada.

Para verificar a atuação do etanol dentro dos parâmetros verificados nas células, este foi aplicado tal como as outras drogas utilizadas neste projeto, aplicado juntamente com a perfusão de ACSF na concentração de 40mM, escolhido com base em estudos anteriores (Deng et al., 2009; Xiao et al., 2009), por um período de tempo entre 8 e 10 minutos.

Os registros de correntes neste estudo incluíram correntes pós-sinápticas excitatórias e inibitórias (EPSCs e IPSCs) que possuem duração por volta de 2ms a 5ms, a frequência da

gravação foi de 10kHz, utilizada para adquirir a quantidade adequada de pontos de dados para garantir uma análise satisfatória das correntes pós sinápticas.

2.2.4 Análise dos dados

As avaliações dos números e das amplitudes das correntes sinápticas foram realizadas utilizando o software MiniAnalysis (Synaptosoft, USA), sendo realizadas por um período de 3 minutos antes (controle) e 3 minutos após a aplicação de álcool (4 minutos depois de o álcool atingir a cuba de registros), e então correntes sinápticas excitatórias ou inibitórias foram analisadas da mesma forma. O teste estatístico Kolmogorov-Smornov (teste KS) foi utilizado para verificar diferenças significantes nas distribuições cumulativas das correntes sinápticas entre o controle e o período com o álcool em células individuais. Comparações entre os grupos foram realizadas com teste T e com o teste de Fisher, utilizando os níveis de significância de 0,05 e os dados oferecem as médias e o erro padrão da média.

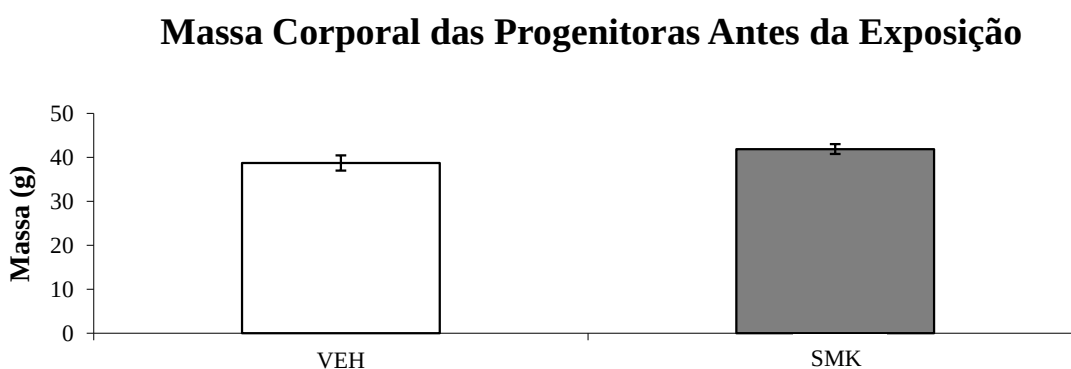
3 RESULTADOS

3.1 Etapa 1 _ Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Estudos Comportamentais

3.1.1 Massa corporal

Não houve diferença de massa corporal quando comparamos as progenitoras VEH e CIG imediatamente antes do primeiro dia de exposição (teste T $p=0,1454$; Figura 9). Contudo, a rANOVA que avaliou a evolução do peso das progenitoras após o nascimento dos filhotes (PN2-PN10) indicou uma interação entre Dia e Tratamento ($F=19,1$; $df=3,3$, $P<0,001$). Mães expostas à fumaça apresentaram menor massa corporal, quando comparadas ao grupo não exposto em todos os momentos aqui avaliados (PN2-10; Figura 10). Adicionalmente, somente progenitoras que não foram expostas a fumaça do cigarro mostraram um aumento na massa corporal durante os dez primeiros dias de lactação.

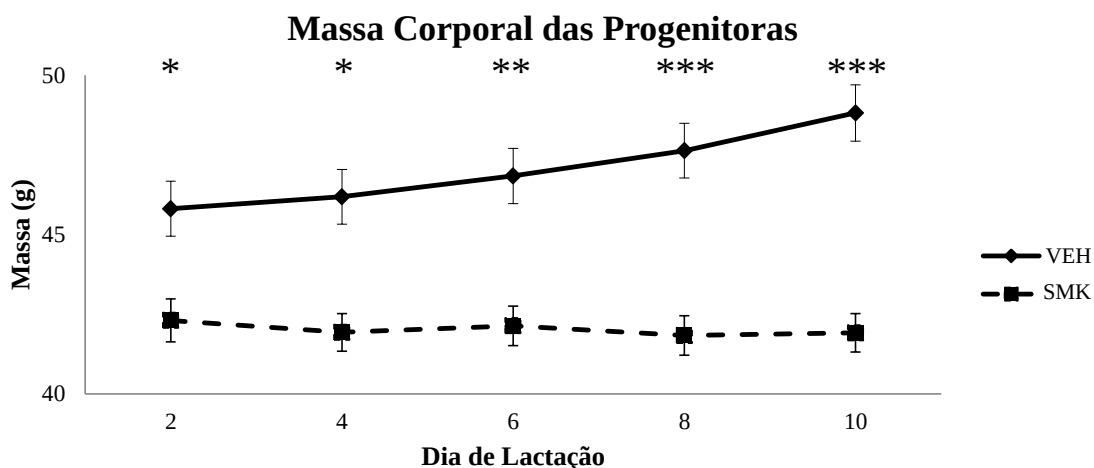
Figura 9 - Massa das progenitoras.



Legenda: Mensurado antes do início da exposição. VEH = animais expostos a ar filtrado; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro.

Fonte: O autor, 2014.

Figura 10 - Ganho de massa das mães.

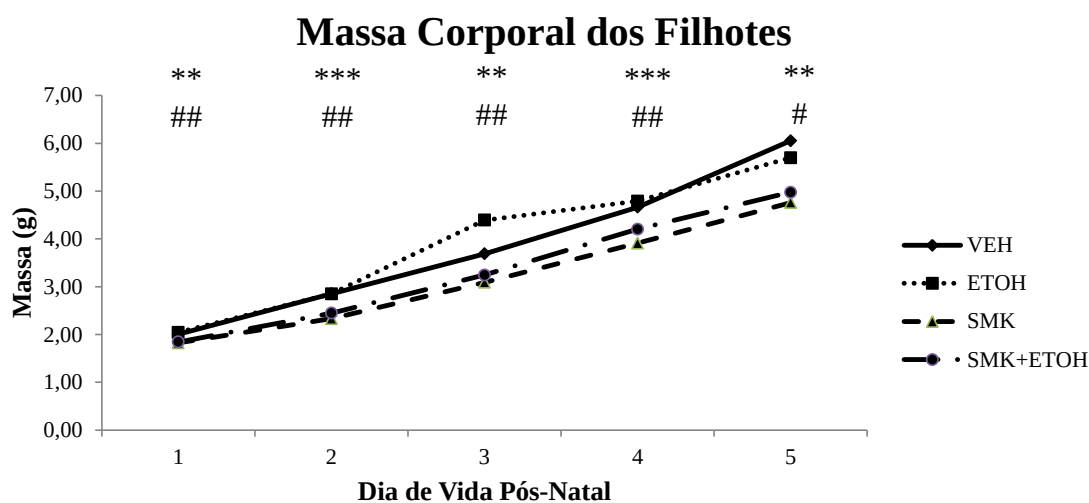


Legenda: Mensurado nos dias em que foi realizada a administração de etanol nos filhotes. VEH = animais expostos a ar filtrado; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro. * representa diferença significativa em relação ao controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: O autor, 2014.

Em relação à prole, a massa corporal aumentou durante os dez primeiros dias de lactação (Dia: $F=370,7$, $df=1,3$, $P<0,001$). Os animais que foram expostos à fumaça do cigarro (grupos SMK e SMK+ETOH) apresentaram menor massa corporal quando comparados com os não expostos do nascimento até PN10 ((Figura 11). Em PN30, nenhuma alteração foi observada entre os grupos (Figura 12). No entanto, em PN90 (Figura 13), a ANOVA indicou uma interação entre Sexo e Tratamento ($F=3,2$; $df=3$, $P<0,05$). Após a separação por sexo, verificou-se efeitos significativos para ambos os sexos (machos: $F=4,1$; $df=3$, $p<0,01$; fêmeas: $F=2,8$; $df=3$, $p<0,05$). Fêmeas ETOH apresentaram menor massa corporal quando comparadas ao grupo VEH ($P=0,01$) e grupo SMK ($P=0,03$). Quanto aos machos, a exposição precoce à fumaça do cigarro causou um aumento tardio na massa corporal na comparação aos demais grupos (SMK>VEH, $P=0,01$; SMK>ETOH, $P=0,04$; SMK>SMK+ETOH, $P=0,04$).

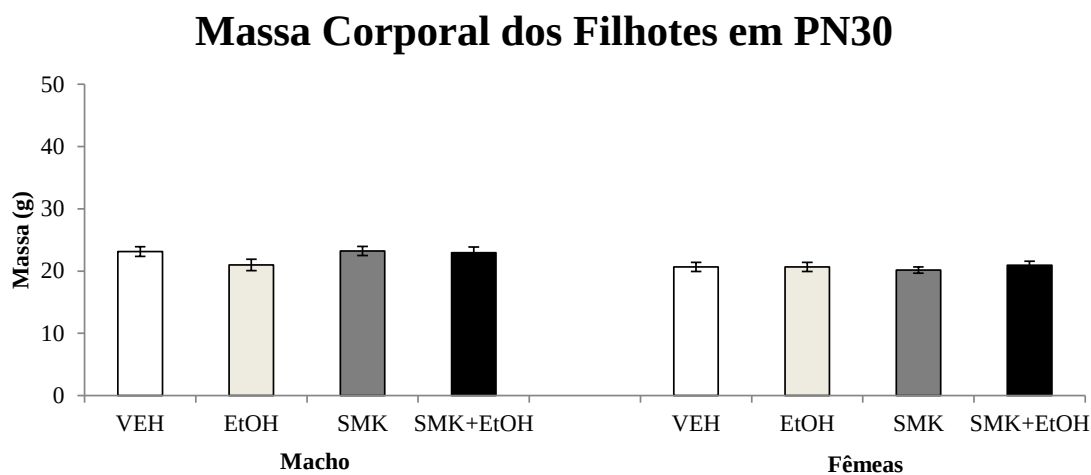
Figura 11 - Ganho de massa dos filhotes



Legenda: No decorrer dos dias mensurados. VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente. * representa diferença significativa do grupo SMK em relação ao grupo VEH. # representa diferença significativa do grupo SMK+ETOH em relação ao grupo VEH.

Fonte: O autor, 2014.

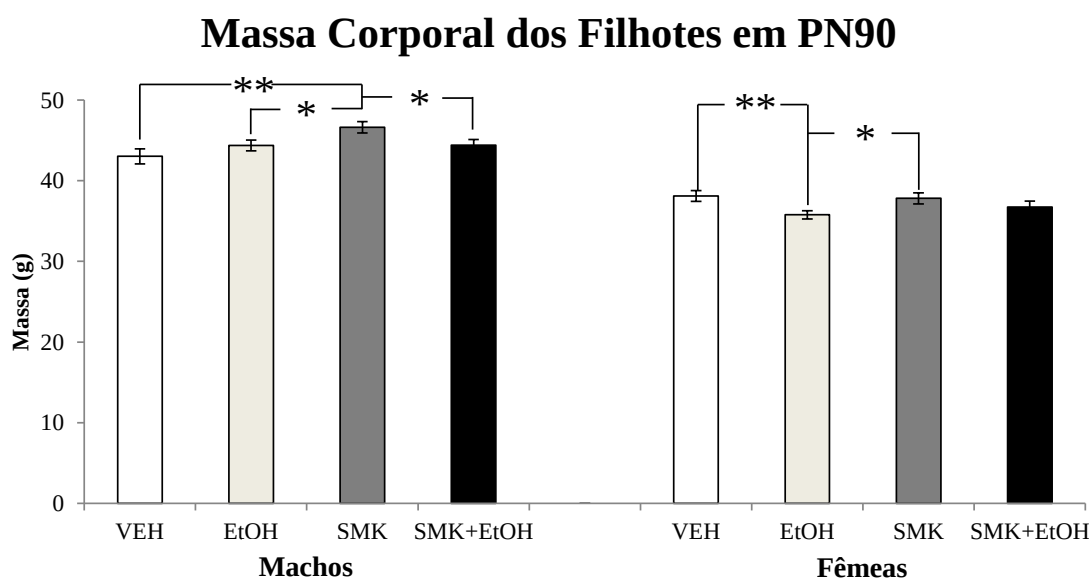
Figura 12 - Massa dos filhotes.



Legenda: Separados por sexo, mensuradas na idade adulta. VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente.

Fonte: O autor, 2014.

Figura 13 - Massa dos filhotes.



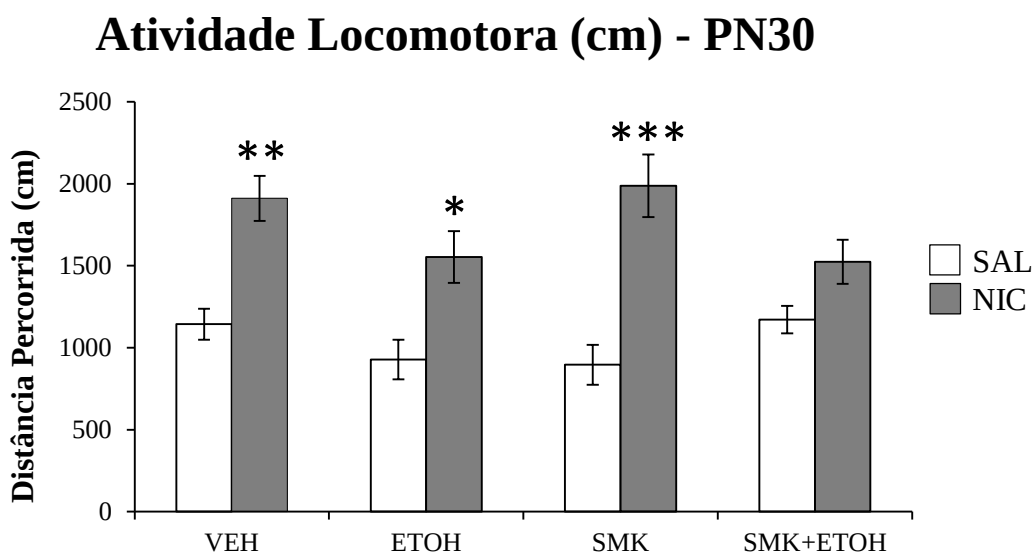
Legenda: Separados por sexo, mensuradas na idade adulta. VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente. * representa diferença significativa, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fonte: O autor, 2014.

3.1.2 Teste de Campo Aberto (CA)

Na avaliação da ambulação total foram encontrados efeitos significativos do tratamento em ambas as idades (PN30 _ $F=4,8$; $df=7$, $P<0,001$ e PN90 _ $F=2,1$; $df=7$, $p<0,05$). Durante a adolescência, a nicotina provocou aumento da atividade locomotora em camundongos VEH (VEH-NIC> VEH-SAL: $P<0,01$), em camundongos ETOH (ETOH-NIC>ETOH-SAL: $P<0,05$) e em camundongos SMK (SMK-NIC>SMK-SAL: $P<0,001$), mas não em animais expostos ao etanol e a fumaça do cigarro (Figura 14). Na idade adulta, aumento provocado pela nicotina na atividade locomotora foi evidente apenas em camundongos expostos à fumaça de cigarro durante o desenvolvimento (SMK-NIC>SMK-SAL, $P<0,05$) (Figura 15).

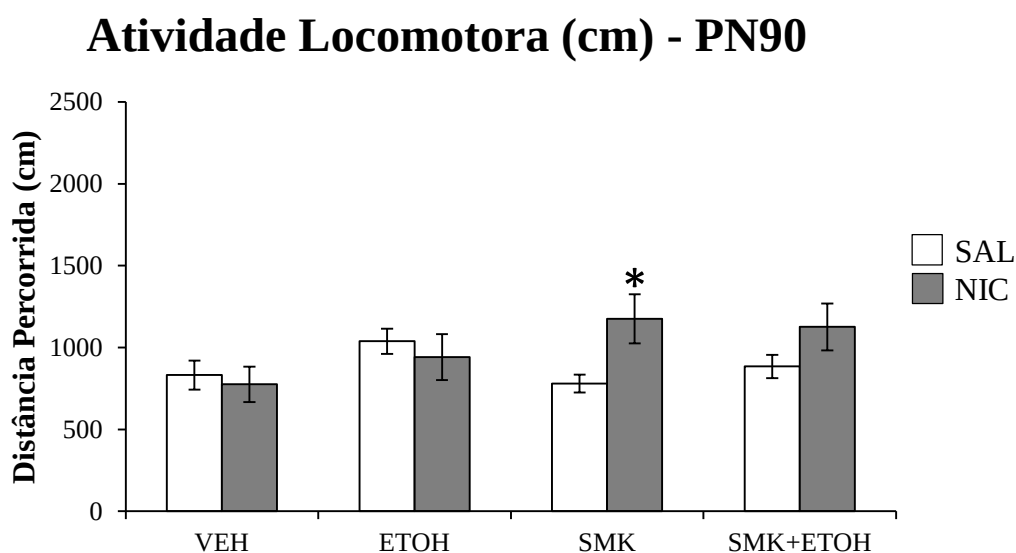
Figura 14 - Tempo total de ambulação na adolescência



Legenda: Mensurado na caixa de atividade na adolescência. VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente. SAL = animais que receberam injeção de salina em PN30, antes de serem submetidos ao teste do campo aberto; NIC = animais que receberam injeção de nicotina em PN30, antes de serem submetidos ao teste do campo aberto. * representa diferença significativa. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fonte: O autor, 2014.

Figura 15 - Tempo total de ambulação na idade adulta

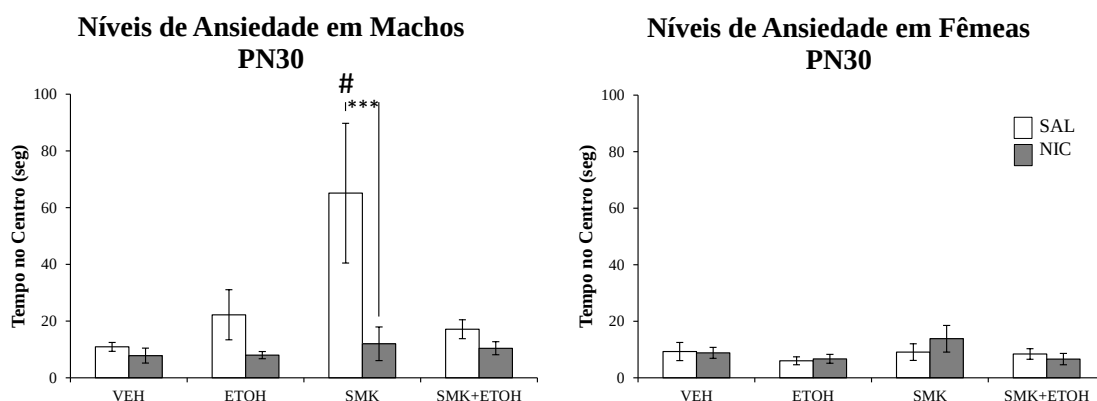


Legenda: Mensurado na caixa de atividade na idade adulta. VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente. SAL = animais que receberam injeção de salina em PN90, antes de serem submetidos ao teste do campo aberto; NIC = animais que receberam injeção de nicotina em PN90, antes de serem submetidos ao teste do campo aberto. * representa diferença significativa. * $p < 0,05$.

Fonte: O autor, 2014.

Quanto ao tempo no centro, a uANOVA indicou uma interação entre Tratamento, Sexo e Idade ($F=3,9$; $df=7$; $P<0,001$). Durante a adolescência, os efeitos do tratamento foram dependentes do sexo (Tratamento $\times$ Sexo: $F=3,7$; $df=7$, $P=0,001$). Após a separação por sexo, apenas os machos demonstraram efeito do tratamento ($F=3,9$; $df=7$; $P=0,01$). A exposição de camundongos machos à fumaça do cigarro durante o desenvolvimento levou a um aumento no tempo do centro, quando comparado com todos os grupos experimentais ($P<0,01$ para todas as comparações) (Figura 16). A administração aguda de nicotina foi capaz de reverter este efeito (SMK-SAL > SMK-NIC, $P<0,001$), os animais submetidos a nicotina imediatamente antes do teste tiveram o tempo no centro reduzidos. Não foram observados efeitos de tratamento ou de interações na idade adulta (Figura 17).

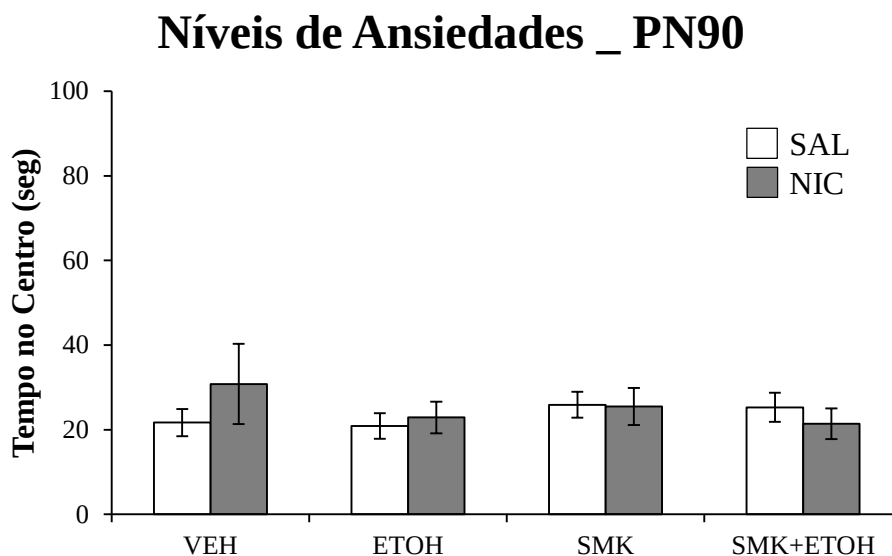
Figura 16 - Tempo de permanência do animal no centro da caixa de atividade na adolescência



Legenda: VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente. CONT = animais que receberam injeção de salina em PN90, antes de serem submetidos ao teste do campo aberto; NIC = animais que receberam injeção de nicotina em PN90, antes de serem submetidos ao teste do campo aberto. * e # representam diferenças significativas. # $p < 0,01$ representa a diferença significativa entre este e os demais grupos SAL representado na figura, *** $p < 0,001$.

Fonte: O autor, 2014.

Figura 17 - Tempo de permanência do animal no centro da caixa de atividade na idade adulta.



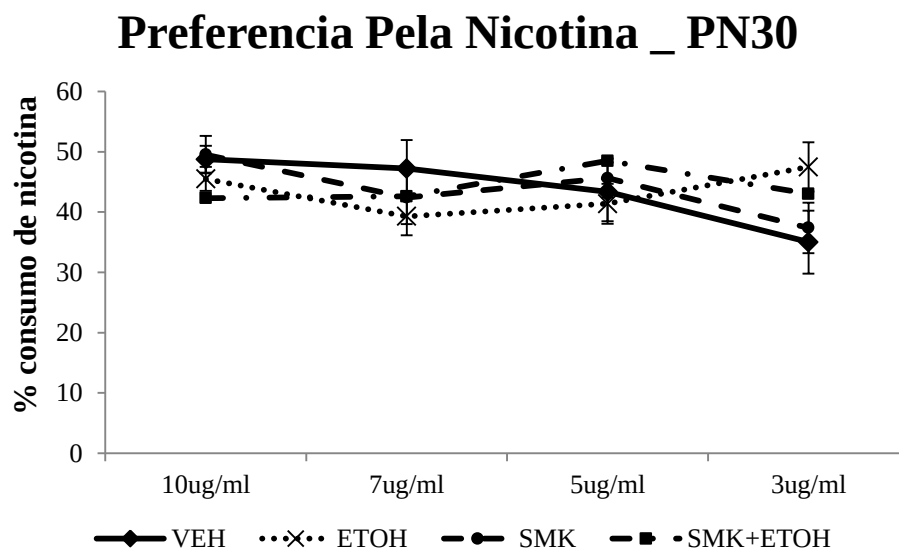
Legenda: VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente. CONT = animais que receberam injeção de salina em PN90, antes de serem submetidos ao teste do campo aberto; NIC = animais que receberam injeção de nicotina em PN90, antes de serem submetidos ao teste do campo aberto.

Fonte: O autor, 2014.

3.1.3 Teste da Preferencia Pela Nicotina (PPN)

As rANOVAs não indicaram quaisquer efeitos do Tratamento ou interações entre Tratamento e os demais fatores, o que indica que a exposição prévia a fumaça de cigarro e/ou etanol não afetou a preferência tardia pela nicotina. Nossos dados revelaram apenas uma interação entre Dose e Idade ($F=3,7$; $df=2,6$, $P<0,05$). Análises separadas para cada idade indicaram efeito significativo da dose unicamente em adultos ($F=3,5$; $df=2,5$, $P<0,05$), o que, em geral, indicou um aumento no consumo de nicotina associado a redução da concentração em todos os grupos experimentais, observado principalmente entre as doses de $10\mu\text{g/ml}$ e $7\mu\text{g/ml}$ (Figura 18 e 19).

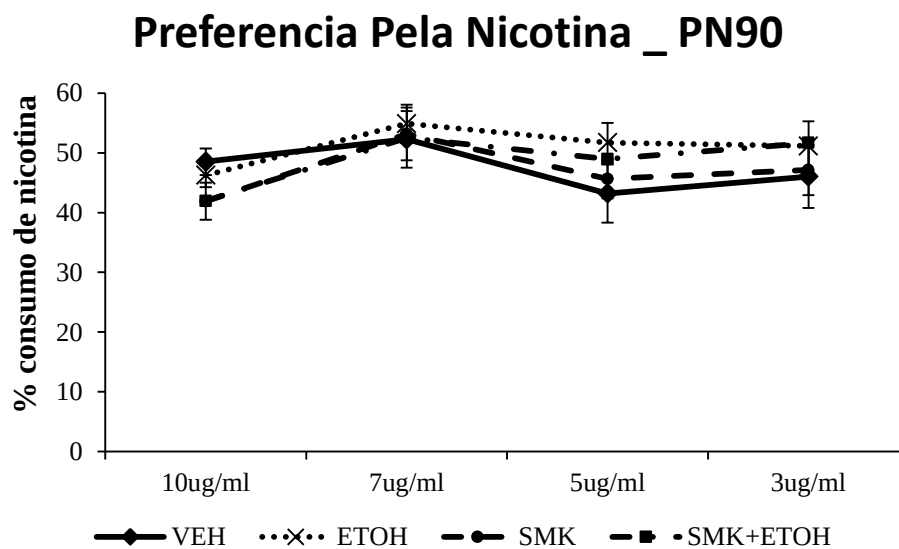
Figura 18 - Media do consumo de nicotina na adolescência



Legenda: Nas diferentes doses utilizadas no Fading Study em ml, na adolescência. VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente.

Fonte: O autor, 2014.

Figura 19 - Media do consumo de nicotina na idade adulta



Legenda: VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente.

Fonte: O autor, 2014.

3.1.4 Teste da Preferencia Condicionada por Lugar (CPP)

A rANOVA indicou um aumento da porcentagem do tempo gasto na câmara não-preferida antes do condicionamento e após o condicionamento com nicotina dos animais tratados (rANOVA: $F = 10,4$, $df = 1$, $P < 0,01$). uANOVA indicou uma interação tratamento $\times$ sexo ($F = 3,5$; $df = 3$; $P < 0,05$) e uma interação idade $\times$ Sexo ($F = 7,8$; $df = 1$; $P < 0,01$). A análise posterior foi realizada considerando idade e sexo. Durante a adolescência, as fêmeas expostas à fumaça, SMK e SMK+ETOH, passaram mais tempo na câmara onde houve o pareamento com nicotina após as sessões de condicionamento (SMK - $P < 0,05$ e SMK+ETOH - $P < 0,01$, teste t pareado, Tabela 1). Ainda para as fêmeas, o grupo ETOH passou mais tempo na câmara onde houve o pareamento com a nicotina, porém a estatística demonstrou somente uma tendência ($P = 0,08$, teste t pareado, Tabela 1).

Considerando-se um índice de condicionamento, apesar de todos os grupos de expostos apresentarem uma pontuação positiva, apenas as fêmeas dos grupos de ETOH e SMK mostraram um aumento do condicionamento, quando comparados com os controles (ETOH>VEH e SMK>VEH, ambas as comparações $P < 0,05$, FIGURA 20). Adolescentes do sexo masculino não apresentaram um padrão de condicionamento (Tabela 1 e Figura 20). Em relação à idade adulta (Figura 21), apenas machos expostos ao etanol passaram muito mais tempo na câmara pareada com a nicotina após as sessões de condicionamento ($p < 0,01$, teste t pareado), porém não foi observado diferença no índice de condicionamento entre machos ETOH adultos e seu respectivo controle (Figura 21). Como esperado, o rANOVA não indicam diferença na porcentagem de tempo gasto na câmara de não-preferida entre o pré-teste e do teste de animais tratados com solução salina.

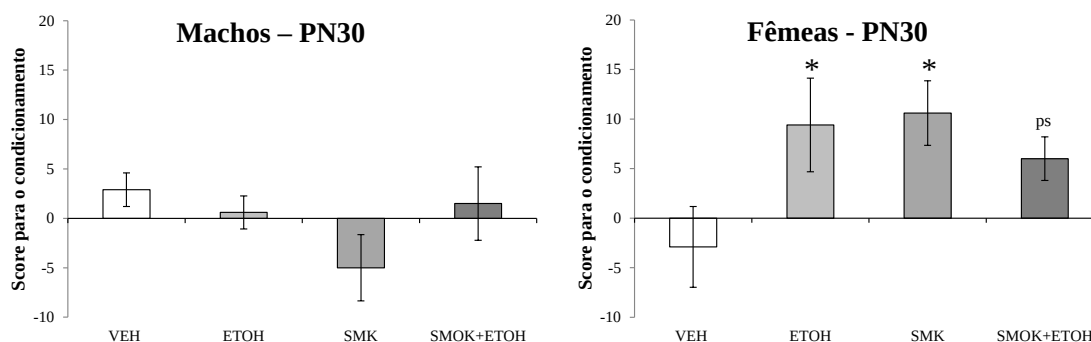
Tabela 1 - Porcentagem do tempo gasto na câmara não-preferida

		Antes do Condicionamento	Após o Condicionamento	Paired <i>t</i> test
Fêmeas Adolescentes	VEH	34.3±2.1	32.6±2.5	P = 0.56
	ETOH	28.5±2.3	34.4±2.3	P = 0.08
	SMK	27.5±1.4	34.2±1.8	P < 0.01
	SMK+ETOH	31.0±1.5	35.1±2.1	P < 0.05
Machos Adolescentes	VEH	28.2±0.8	29.9±1.1	P = 0.12
	ETOH	32.6±1.7	33.2±2.0	P = 0.61
	SMK	30.6±1.1	28.3±2.3	P = 0.22
	SMK+ETOH	30.7±1.4	31.7±1.9	P = 0.67
Fêmeas Adultas	VEH	27.3±1.6	28.2±1.9	P = 0.65
	ETOH	31.0±1.1	32.2±1.5	P = 0.52
	SMK	28.3±1.1	32.4±2.6	P = 0.11
	SMK+ETOH	29.4±1.5	28.8±1.6	P = 0.78
Machos Adultos	VEH	30.0±1.8	33.6±3.0	P = 0.28
	ETOH	25.6±1.5	32.0±1.6	P = 0.01
	SMK	30.7±1.3	31.5±0.9	P = 0.54
	SMK+ETOH	30.4±1.5	34.0±3.1	P = 0.16

Legenda: Média e erro padrão da média. Teste *t* pareado para as médias de tempo em porcentagem antes e depois do condicionamento. VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; SMK = animais expostos à fumaça de cigarro; SMK+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente.

Fonte: O autor, 2014.

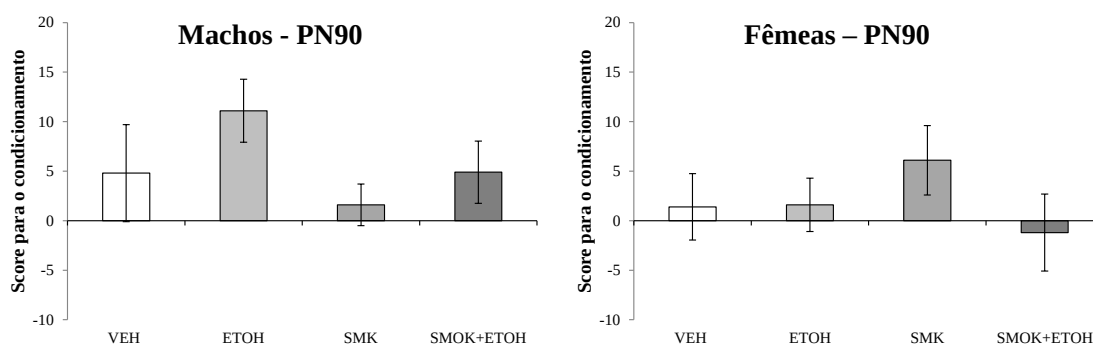
Figura 20 - Índice de condicionamento na adolescência



Legenda: Divididos aqui em pelo sexo sendo todos animais condicionados ao lado não preferido. VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; CIG = animais expostos à fumaça de cigarro; CIG+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente. * representa diferença significativa. * *p* < 0,05.

Fonte: O autor, 2014.

Figura 21 - Índice de condicionamento na idade adulta



Legenda: Divididos aqui em pelo sexo sendo todos animais condicionados ao lado não preferido. VEH = animais expostos a ar filtrado; ETOH = animais que receberam etanol; CIG = animais expostos à fumaça de cigarro; CIG+ETOH = animais expostos a fumaça de cigarro que receberam álcool concomitantemente.

Fonte: O autor, 2014.

3.2 Etapa 2 _ Universidade de Copenhagen – Estudos Eletrofisiológicos

Foram avaliados os efeitos da aplicação aguda de 40mM de etanol sobre as transmissões sinápticas tanto excitatórias (EPSC) quanto inibitórias (IPSC) do LDT. Esta concentração de etanol foi escolhida baseada em estudos anteriores onde foi mostrada a modificação efetiva dos padrões de correntes normais (Deng et al., 2009; Xiao et al., 2009). Curiosamente, os efeitos encontrados neste trabalho não reverteram ao longo de 10 ou 15 minutos de lavagem com solução ACSF.

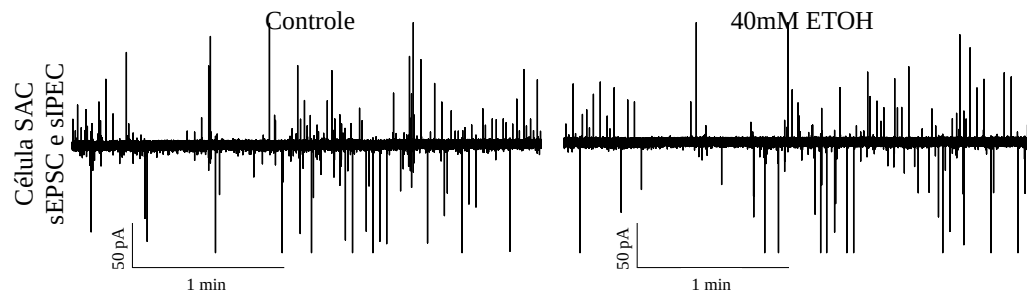
3.2.1 Etanol e Eventos Espontâneos

O observado foi uma diminuição da frequência de disparos espontâneos principalmente nos animais SAC (animais que não foram expostos à nicotina durante a gestação) onde esta redução foi mais acentuada ($p < 0,05$) (figura 22C). Das 9 células analisadas, em 7 houve redução na frequência enquanto que nas 8 células de animais EPN (animais expostos à nicotina durante a gestação) somente 2 apresentaram redução na frequência de disparos em resposta ao etanol ($p = 0,2$). Ao realizarmos um teste de Fisher's com estas células vemos uma diferença próxima da significativa entre animais que foram expostos e animais que não foram expostos à nicotina durante a gestação ($p = 0,05$).

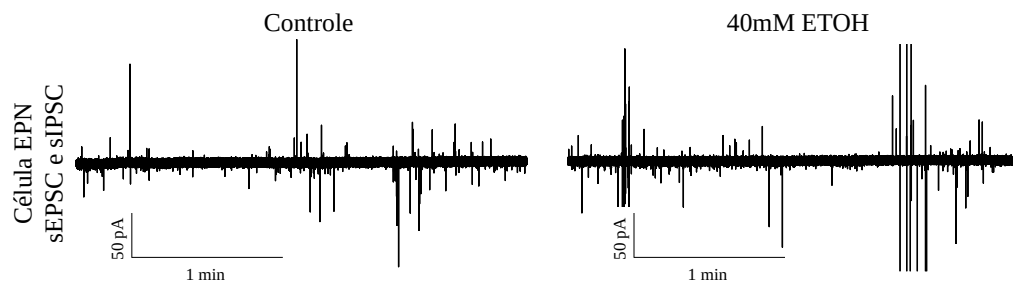
Junto com as alterações na frequência, foi constatado também um aumento na corrente basal (figura 22D) aplicada às células expostas ao etanol para que a manutenção da voltagem permanecesse em -60mV, de uma média de -8,5pA para -4.6pA (erro padrão de $\pm 1,8$ pA). Porém este aumento somente foi significativo em células analisadas de animais EPN ($p < 0,05$) enquanto que a redução mensurada em células provindas de animais SAC não demonstraram significância ($p = 0,1$).

Figura 22 - Eventos Espontâneos.

A

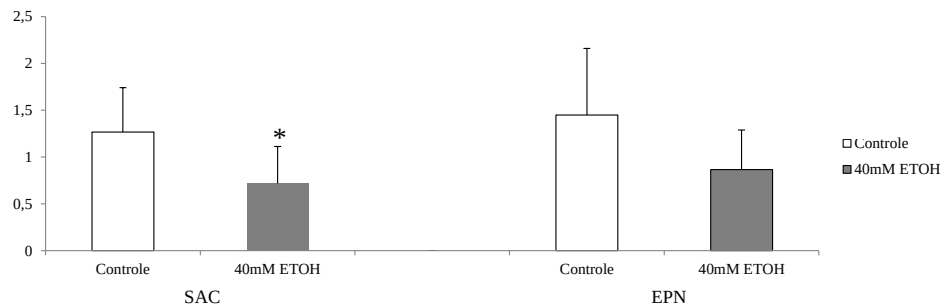


B



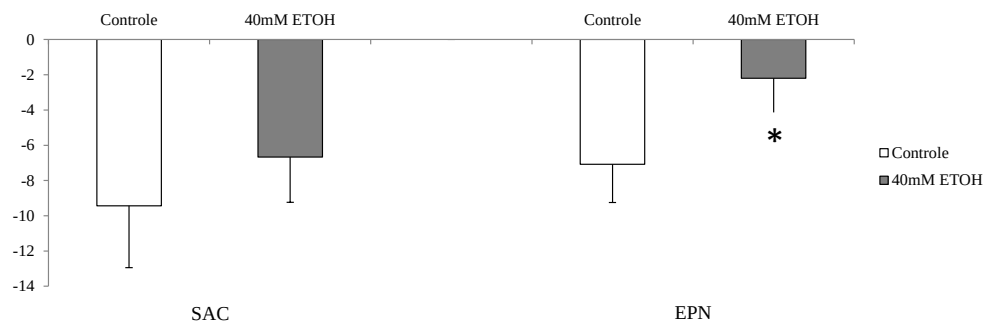
C

Média da Frequência de sEPSC e sIPSC (Hz) - SAC e EPN



D

Média da Corrente Basal de sEPSC e sIPSC (pA) - SAC e EPN



Legenda: Traços representativos de sEPSC e sIPSC. (A) células de animais SAC e (B) células de animais EPN antes (Controle) e depois da aplicação de 40mM de etanol (40mM ETOH). (C) Efeitos do etanol na frequência de sEPSC e sIPSC em células SAC e em células EPN. (D) Efeitos do etanol na corrente basal em células SAC e em células EPN. * representa diferença significativa. * $p < 0,05$.

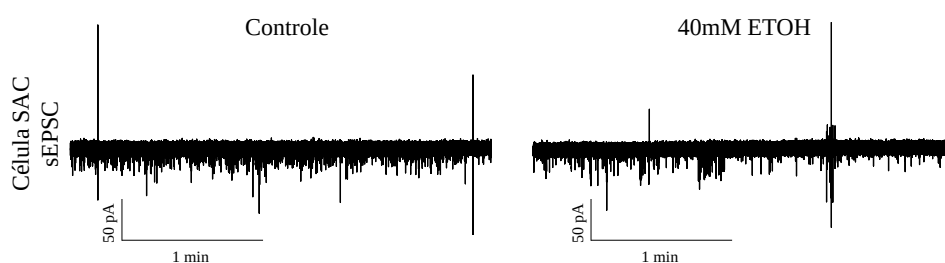
Fonte: O autor, 2014.

3.2.2 Etanol e Eventos Excitatórios Espontâneos

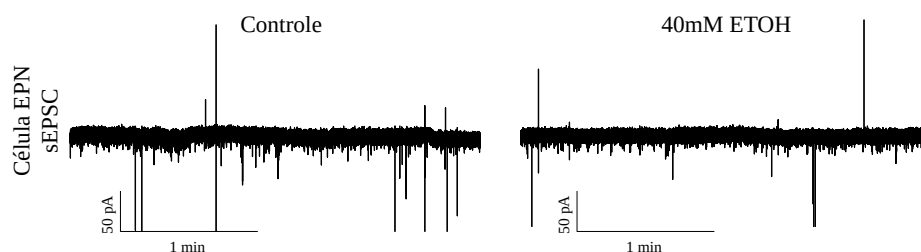
A aplicação do etanol não foi capaz de alterar de forma significativa a frequência de disparos das transmissões excitatórias glutamatérgicas espontâneas (sEPSC) avaliadas em células de ambos os grupos (figura 23C) (SAC; $n=8$ $p=0,6$ e EPN; $n=8$ $p=0,2$). Porém, se observa uma significativa redução já nos registros basais, antes da aplicação do etanol. Na comparação entre os dois grupos de células analisadas, SAC e EPN, a redução foi expressiva ($p<0,05$).

Figura 23 - Eventos Excitatórios Espontâneos

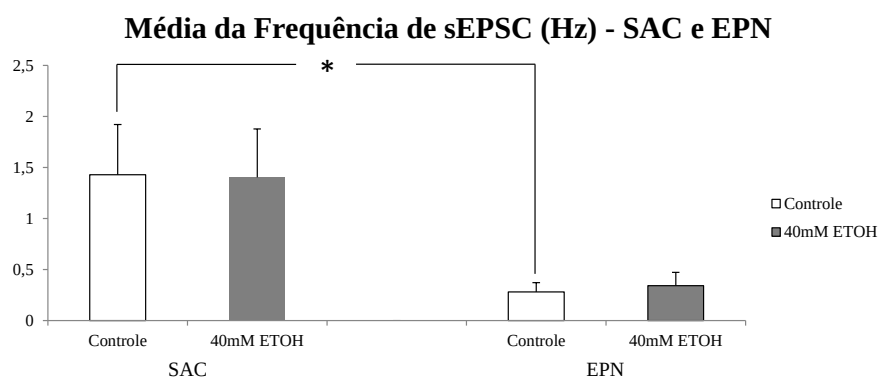
A



B



C



Legenda: Traços representativos de sEPSC. (A) células de animais SAC e (B) células de animais EPN antes (Controle) e depois da aplicação de 40mM de etanol (40mM ETOH). (C) Efeitos do etanol na frequência de sEPSC em células SAC e em células EPN. * representa diferença significativa. * $p < 0,05$.

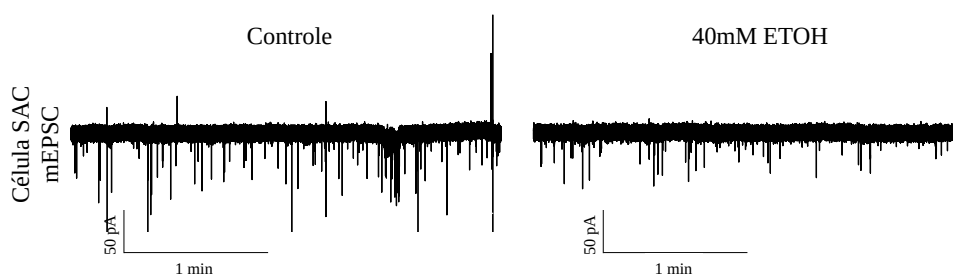
Fonte: O autor, 2014.

3.2.3 Etanol e Eventos Excitatórios Independentes de Redes de Comunicação Neural

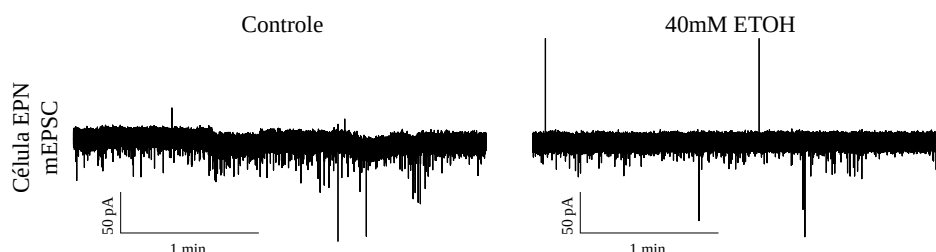
Nestas condições o etanol foi capaz de inibir a frequência de disparos de transmissões excitatórias glutamatérgicas em miniatura (mEPSC) de todas as células avaliadas em ambos os grupos (figura 24C). Porém, somente no grupo EPN esta redução foi significativa (SAC; $n=8$ $p=0,1$ e EPN; $n=8$ $p<0,05$).

Figura 24 - Eventos Excitatórios Independentes de Redes de Comunicação Neural

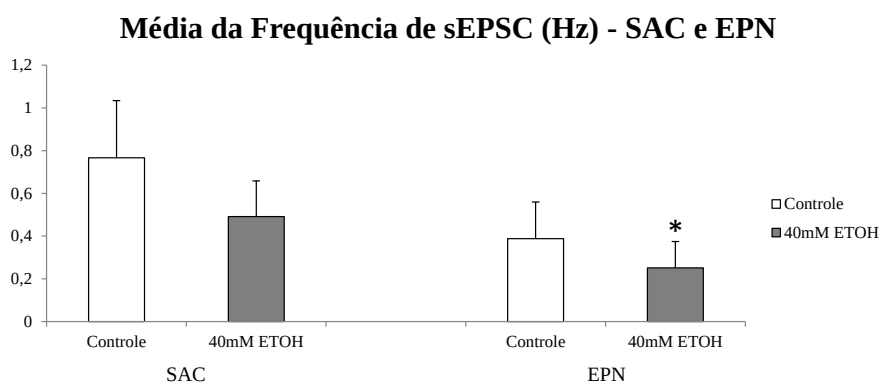
A



B



C



Legenda: Traços representativos de mEPSC. (A) células de animais SAC e (B) células de animais EPN antes (Controle) e depois da aplicação de 40mM de etanol (40mM ETOH). (C) Efeitos do etanol na frequência de mEPSC em células SAC e em células EPN. * representa diferença significativa. * $p < 0,05$.

Fonte: O autor, 2014.

3.2.4 Etanol e Eventos Inibitórios Espontâneos e Independentes de Redes de Comunicação Neural

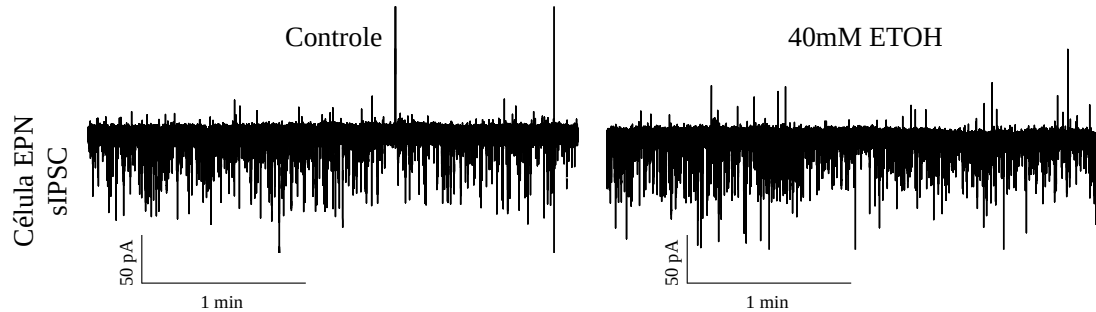
Uma vez já tendo estabelecido que a aplicação aguda de etanol exerce efeitos em transmissões excitatórias de neurônios de LDT, foram então avaliados os impactos da administração aguda de etanol nas transmissões inibitórias. Não foram encontradas modificações para frequências nestes parâmetros, nem decorrentes da aplicação de etanol ou devido à pré-exposição à nicotina, independente de ter sido espontâneo (sIPSC) (figura 25B) ou independente de rede de comunicação neural (mIPSC) (figura 26C).

No entanto, as avaliações das amplitudes demonstraram uma redução em decorrência da exposição ao etanol em células SAC tanto pra sIPSC (figura 25C) quanto para mIPSC (figura 26D) ($p < 0,05$ e $p < 0,05$ respectivamente).

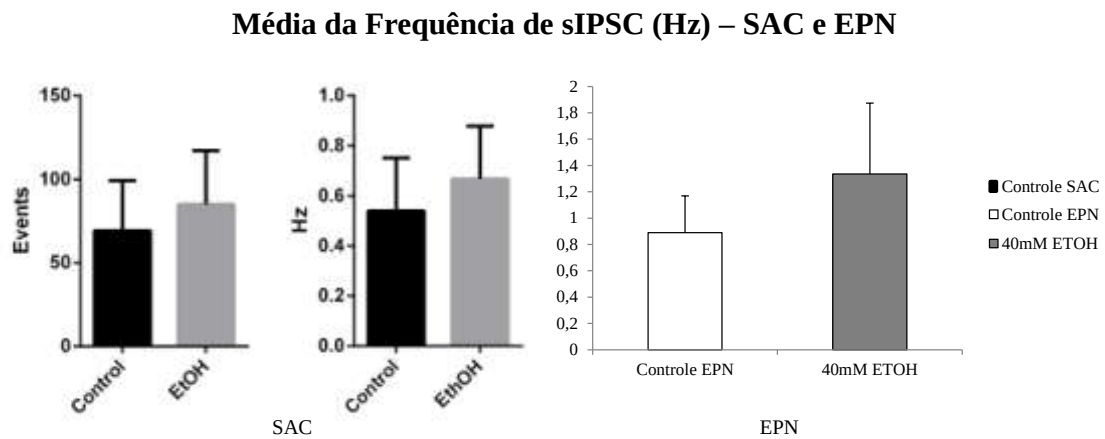
Outra observação interessante feita em células mIPSC foi um aumento na corrente basal, de uma média de $-16,6\text{pA} \pm 6,3\text{pA}$ para $-8,4\text{pA} \pm 4,5\text{pA}$ ($p < 0,05$) (figura 26E) para as células SAC, e uma tendência de inversão deste padrão em células EPN. Mais interessante ainda foi o fato de que para este parâmetro, os registros de controle das células SAC e EPN apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 25 - Eventos inibitórios espontâneos

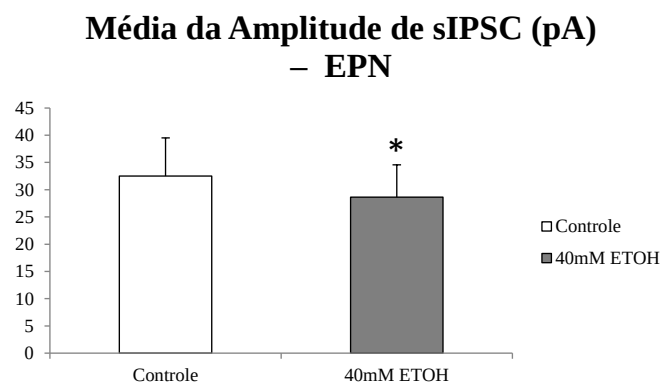
A



B



C

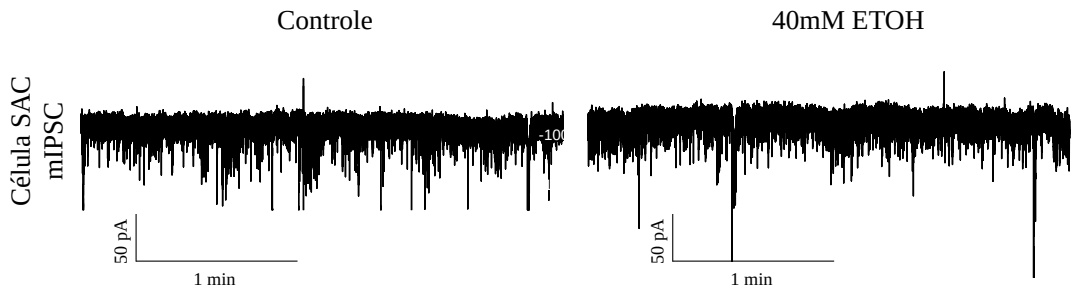


Legenda: Traços representativos de sIPSC. (A) células de animais EPN antes (Controle) e depois da aplicação de 40mM de etanol (40mM ETOH). (B) Efeitos do etanol na frequência de sIPSC em células SAC e em células EPN. (C) Efeitos do etanol na amplitude de células SAC e em células EPN. * representa diferença significativa. * $p < 0,05$.

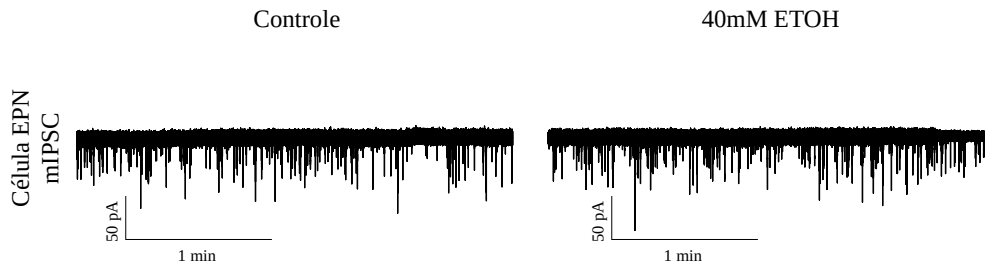
Fonte: O autor, 2014.

Figura 26 - Eventos Inibitórios Independentes de Redes de Comunicação Neural (continua)

A



B



C

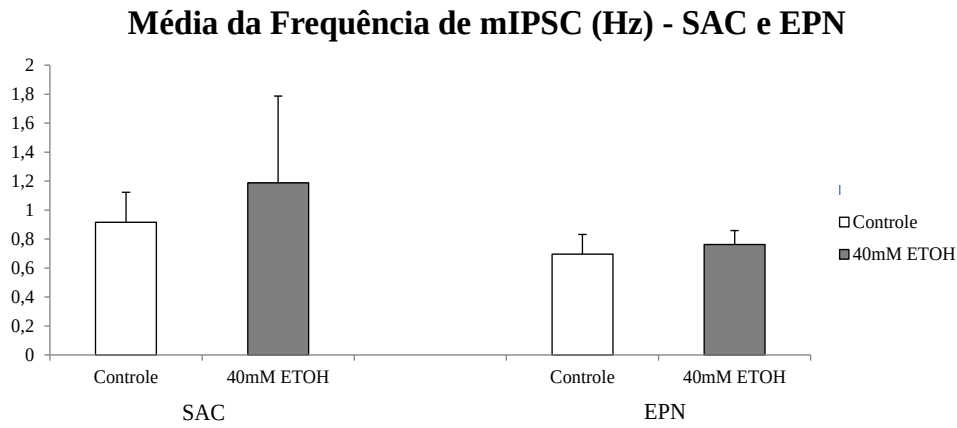
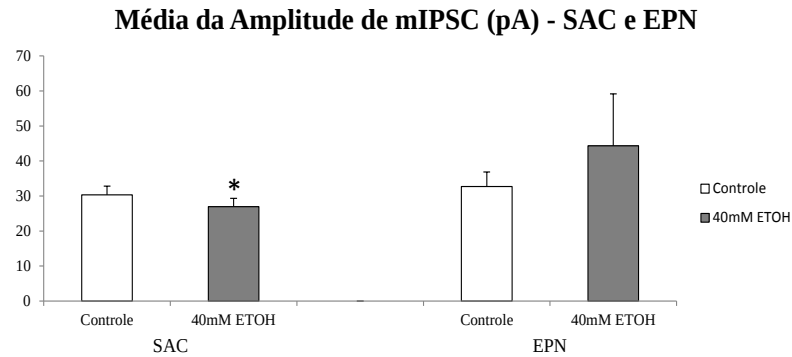
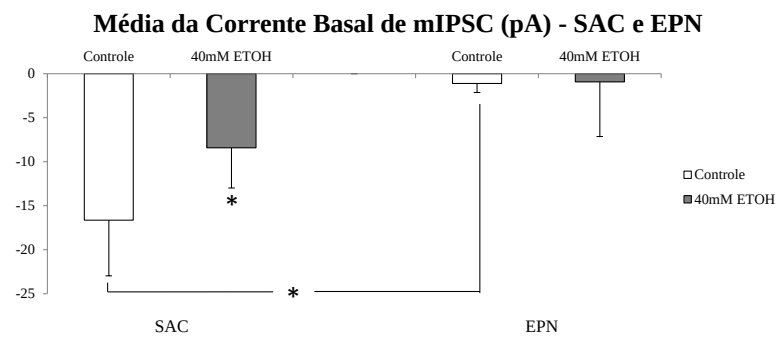


Figura 26 - Eventos Inibitórios Independentes de Redes de Comunicação Neural (conclusão)

D



E



Legenda: Traços representativos de sIPSC. (A) células de animais SAC e (B) células de animais EPN antes (Controle) e depois da aplicação de 40mM de etanol (40mM ETOH). (C) Efeitos do etanol na frequência de sIPSC em células SAC e em células EPN. (D) Efeitos do etanol na amplitude de células SAC e em células EPN. (E) Efeitos do etanol na corrente basal em células SAC e em células EPN. * representa diferença significativa. * $p < 0,05$.

Fonte: O autor, 2014.

4 DISCUSSÃO

4.1 Etapa 1 _ Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Estudos Comportamentais

Apesar dos efeitos biológicos da fumaça do tabaco e do etanol serem muito estudados, a co-exposição durante o desenvolvimento precoce têm recebido pouca atenção (Bienand e Burge 1990; Dierker et al. 2006; Istvan and Matarazzo 1984; Miller and Gold 1998; Weitzman and Chen 2005; Yates et al. 1998). Alguns estudos recentes indicaram que a co-exposição à nicotina e ao etanol pode predispor na uma prole uma maior suscetibilidade a nicotina, o que poderia indicar uma marcada vulnerabilidade do individuo a tornar-se dependente de fumo do tabaco (Matta e Elberger, 2007). No entanto, o tabaco tem mais de 4500 substâncias identificadas e não há evidências de que outros componentes além da nicotina desempenham um papel importante nos efeitos do tabaco (Rose, 2006). Neste sentido, usamos um modelo de exposição à fumaça do tabaco durante toda a gestação e até o período pós-natal PN10, periodo pós natal este que é equivalente em roedores ao terceiro trimestre da gestação humana (um período crítico de desenvolvimento do cérebro), associado a uma exposição de etanol equivalente ao terceiro trimestre de desenvolvimento cerebral humano, a fim de investigar os efeitos da exposição destes dois agentes durante o desenvolvimento na suscetibilidade à nicotina.

4.1.1 Modelos de exposição

4.1.1.1 Exposição ao álcool

Em linhas gerais, o uso de roedores têm se mostrado efetivo na caracterização da fenomenologia, patologia e fatores de risco associados com a exposição precoce ao etanol (Becker et al., 1996; Cudd, 2005; Hannigan, 1996; Hannigan e Berman, 2000). Ratos e camundongos apresentam uma série de comportamentos bem estabelecidos na literatura e que são amplamente utilizados como ferramentas para estudar diversas condições neuropatológicas associadas com a exposição pré-natal ao álcool em humanos (Becker et al.,

1996; Cudd, 2005; Hannigan, 1996). Além disso, graças ao desenvolvimento das técnicas de manipulação genética, existem hoje diversas linhagens, principalmente de camundongos, transgênicas e *knockouts* com grande potencial para estudar os efeitos teratogênicos do álcool (Cudd, 2005; Suckow, 2001).

De modo análogo ao observado em humanos, roedores expostos ao etanol durante o desenvolvimento apresentam retardo de crescimento, anomalias crânio-faciais e uma série de distúrbios neurocomportamentais como a hiperatividade locomotora (Gilbertson e Barron, 2005; Melcer et al., 1994; Tran et al., 2000) e déficits de aprendizado e memória (Becker et al., 1996; Berman e Hannigan, 2000).

De modo importante, os resultados da experimentação em roedores vão além da simples reprodução dos achados em humanos. De especial interesse são os estudos que sugerem que o tipo de anomalia provocada pelo etanol depende, além da quantidade consumida, do momento do desenvolvimento em que ocorre a exposição (Becker et al., 1996; Hannigan, 1996). Em camundongos, uma única exposição ao etanol no 7º dia gestacional resulta em defeitos crânio-faciais semelhantes aos observados em crianças com FAS que incluem olhos pequenos com fissuras palpebrais curtas, hipoplasia na porção média da face, narina reduzida, lábio superior bem mais fino que o inferior e o *philtrum* achatado (Sulik, 2005). A exposição ao álcool durante a segunda metade da gestação (do 12º ao 17º dia gestacional) parece ser um período importante para produção do retardo do crescimento em camundongos (Middaugh e Boggan, 1991).

Do ponto de vista neurocomportamental, trabalhos realizados por diversos grupos de pesquisa vêm demonstrando de modo consistente que, em ratos e camundongos, os dez primeiros dias de vida pós-natal são um período crítico para a manifestação dos transtornos neurocomportamentais causados pelo etanol como a hiperatividade locomotora (Kelly et al., 1987; Melcer et al., 1994; Nunes et al., 2011; Riley et al., 1993; Slawecki et al., 2004; Thomas et al., 2001) e os déficits de aprendizado e memória (Filgueiras et al., 2009a; Filgueiras et al., 2010).

Um dado interessante observado para o desenvolvimento do sistema nervoso central de roedores é que o período equivalente terceiro trimestre de gestação humana (Slawecki et al., 2004; Thomas et al., 2001, 2007) corresponde ao primeiro de 10 dias período após o nascimento. Durante este período ocorre a neurogênese, arborização dendrítica, sinaptogênese e a migração de várias populações neuronais no sistema nervoso central (Bandeira et al., 2009; Dobbing e Sands, 1979), que caracterizam este período como um período de vulnerabilidade. Com base nisto, no presente estudo, utilizamos um modelo de exposição ao etanol durante

este período. Na verdade, este modelo tem sido eficaz na gerou algumas deficiências observadas na SAF (Filgueiras et al, 2009;. 2010;. Nunes et al, 2011), como hiperatividade e déficits de memória/aprendizagem. No presente estudo, não houve diferenças significativas entre a exposição dos animais a etanol ou solução salina sobre o ganho de peso durante o período de tratamento, conforme descrito em estudos anteriores (Filgueiras et al, 2009;. Nunes et al, 2011).

4.1.1.2 Exposição ao tabaco

Ao avaliar modelos animais para exposição à nicotina durante o desenvolvimento, é importante considerar a dose, data de início, a duração da exposição no contexto da expressão de nAChRs e eventos no decorrer do desenvolvimento. Quando o que se espera é caracterizar o fenótipo resultante a partir de exposição fetal continua, um tratamento mais longo se faz necessário, no entanto, se o foco for determinar mecanismos específicos por trás dos efeitos da exposição à nicotina, pode ser mais benéfico utilizar uma janela de exposição mais limitada a eventos pontuais no desenvolvimento, cuja perturbação é responsável por alterações comportamentais.

A nicotina, como já foi descrito, é conhecida como um agente de reforço primário e é sabido que ela tem efeitos neurotóxicos (Ginzel et al., 2007), sendo capaz de atravessar a barreira placentária até atingir o sangue e o cérebro do feto (Luck et al., 1985). Desta forma, para se ter um modelo animal apropriado, a escolha da dose, via de administração, momento de início e duração da exposição deve ser feito de acordo com a natureza da investigação, o que levou ao surgimento de diversos modelos descritos na literatura científica básica.

Uma solução encontrada para os primeiros estudos com animais sobre nicotina gestacional foi mimetizar a farmacocinética do tabagismo utilizando injeções subcutâneas intermitentes de nicotina, tipicamente duas ou três por dia. No entanto este modelo gerou diversos paradigmas, um deles é que estas injeções podem resultar em estresse na mãe, promovendo liberação de glicocorticóides que atravessam a placenta atingindo o feto. Existe uma substancial literatura sugerindo que esta exposição pré-natal a glicocorticóides já produz efeitos adversos por si próprios (para revisão ver Seckl e Holmes, 2007). Em adição, estas injeções podem causar vasoconstrição, resultando em hipóxia no feto (Slotkin et al., 1987).

Já esta bem estabelecido que hipóxia pode causar efeitos prejudiciais ao feto (para revisão ver Rees e Inder, 2005), e assim, deixar mais complexos estudos deste tipo.

Um modelo de administração de nicotina bastante popular é realizado através de mini-bombas osmóticas implantadas subcutaneamente que liberam, devagar e constantemente, uma carga de nicotina (Slotkin, 1998). Embora este modelo reduza o estresse e a hipóxia, que por si só já causam efeitos prejudiciais ao feto (para revisão ver Seckl e Holmes, 2007; Slotkin et al., 1987; Rees e Inder, 2005) geralmente associados a outros modelos, como injeções intermitentes de nicotina subcutânea, ele não mimetiza a farmacocinética do tabagismo ou terapias intermitentes de reposição de nicotina (goma de nicotina, por exemplo), mas fornece um bom modelo para o sistema de 24h de nicotina.

Adicionalmente, alguns grupos têm administrado nicotina diluída em água (Ribeiro-Carvalho et al. 2009; Ribeiro-Carvalho et al., 2008). Neste tipo de administração utiliza-se uma garrafa graduada para seja realizada a aferição do quanto foi ingerido pelo animal. Este modelo de exposição é um método não invasivo e já está bem estabelecido para este propósito. O consumo de nicotina através da água é capaz de produzir um aumento da concentração de nicotina e da cotinina (principal metabólito da nicotina) no sangue, de tal forma que uma vez consumida por fêmeas grávidas também tem a capacidade de atingir os fetos (Grabus et al., 2005; Pauly et al., 2004; Sparks e Pauly 1999). Adicionalmente, a exposição de nicotina através da água oferece uma contínua exposição de nicotina durante o período de atividade do ciclo circadiano do animal (Pauly et al., 2004) o que pode ser comparado aos padrões encontrados em humanos.

Camundongos mostram aversão ao sabor da nicotina, porém a solução de nicotina é usualmente misturada a 2% de sacarina a fim de mascarar o gosto amargo e aumentar o consumo (Grabus et al., 2005; Matta et al., 2007). Em fêmeas grávidas, o consumo oral de nicotina não parece alterar o ganho de peso ou a ingestão de comida e nem alterar o ganho de peso dos filhotes pré ou pós-natalmente (Pauly et al., 2004; Sparks e Pauly 1999). Em animais adultos, o consumo crônico de soluções de nicotina com concentrações maiores que 100µg/ml tem sido demonstrado que induz sinais de tolerância à injeções agudas de nicotina (Grabus et al., 2005). Bem como após o término de um tratamento crônico de nicotina, sinais de sintomas de retirada/abstinência têm sido bem demonstrado usando este modelo de exposição (Grabus et al., 2005; Sparks e Pauly 1999). Em filhotes, similarmente a outros modelos de exposição pré-natal, aumentos na preferência pela nicotina têm sido demonstrado (Chistyakov et al., 2010; Klein et al., 2003). O aumento no número de receptores do tipo nAChRs após o consumo crônico de soluções de nicotina também tem sido observado

(Pakkanen et al., 2005; Sparks e Pauly 1999). Tomando todas as informações, observamos que este modelo apresenta ambas as alterações desejadas, comportamentais e neuronais, associadas a uma exposição de nicotina. Logo, o consumo oral de soluções de nicotina oferece um fácil, não invasivo e validado método de exposição de fetos a nicotina que resultam em indicadores comportamentais de um aumento de sensibilidade às propriedades de recompensa da nicotina. Devido a estes fatores e por já ser um modelo utilizado (Christensen et al., 2014), esta forma de administração foi adotada para execução da investigação na etapa 2 deste projeto, realizada na Universidade de Copenhague na Dinamarca, para as investigações eletrofisiológicas.

Porém, a exposição à nicotina somente não é um modelo totalmente adequado de uso de tabaco. Por causa da considerável quantidade de constituintes químicos do tabaco, cerca de 4500 outros componentes além da nicotina, muitos dos quais provavelmente exercem os seus próprios efeitos sobre o cérebro (Rose, 2006), alguns grupos, na tentativa de encontrar um melhor modelo de tabagismo materno, submeteram ratas grávidas à exposição à fumaça do cigarro (Carmines et al., 2003). De fato, estudos anteriores sugeriram que os alcalóides secundários encontrados na folha de tabaco são capazes de aumentar os efeitos da nicotina em ratos (Clemens et al., 2009), ou são simplesmente capazes de produzir efeito de reforço por si próprio (Bardo et al., 1999).

Este tipo de exposição tem a vantagem de que esta pode se aproximar ao tipo de absorção flutuante de nicotina e manutenção das concentrações encontradas em humanos (Cohen e George 2013; Farkas et al., 2006) não somente da nicotina, mas também das outras substâncias que são normalmente veiculadas ao usuário junto com a nicotina, fazendo com que a aplicação da fumaça exponha a gestante e os fetos a todos os outros componentes também (Chambers et al., 2011; Talhout et al., 2011). Componentes estes que, embora formem um contexto ainda mais complexo, compõe o quadro normal dos tabagistas.

Porém, é provável que o pulmão de ratos não consiga absorver os componentes do tabaco tal como um pulmão humano (Coggins, 2007). Desta forma, apesar dos outros potenciais componentes presentes na fumaça do cigarro, o tratamento utilizando somente com nicotina continua a ser o modelo mais utilizado no estudo em animais dos efeitos do tabagismo materno, o que leva a haver na literatura muita informação sobre efeitos da exposição pré-natal à nicotina somente, mas pouca informação sobre os efeitos da fumaça de cigarro, fato este que interessantemente confere uma vantagem adicional a este trabalho, uma vez que o modelo proposto para a investigação conduzida na etapa 1 do projeto utiliza uma máquina de exposição a fumaça de cigarro.

Em todos estes modelos a dose de nicotina usada é um importante fator a ser levado em consideração. Altas doses resultam em hipóxia e diminuição do ganho de peso das mães devido ao retardo no crescimento dos fetos (Slotkin et al., 1987; Slotkin, 1998). Uma dose adequada ao estudo deve ser identificada afim de que sejam reproduzidos, e assim extrapolados, dados encontrados na população humana. Em um estudo anterior (Abreu-Villaça et al., 2013), que utilizou o mesmo padrão de exposição à fumaça (exposição do corpo inteiro para 8 h/dia) e os mesmos cigarros de pesquisa de referência (nicotina = 0,7 mg/cigt), foi encontrado um nível plasmático de cotinina (metabólito da nicotina) por volta de 68 ng/ml. Estes níveis séricos são comparáveis com aqueles comumente encontrados no tabagismo materno moderado (Ivorra et al., 2014).

4.1.2 Massa corporal

4.1.2.1 Massa corporal das progenitoras

Antes do inicio da exposição à fumaça de cigarro, foi feita uma avaliação da massa corporal das fêmeas utilizadas neste projeto. Como esperado, não foi constatado diferenças entre camundongos progenitoras que foram escolhidas para serem expostas à fumaça em comparação a aquelas que iriam receber ar corrente, o que indica que não houve tendência na escolha dos animais para serem submetidas para o tratamento.

Uma vez que os animais utilizados como matrizes neste projeto não foram submetidas ao tratamento com etanol, estas foram apenas divididas com base na exposição a maquina de fumaça, sendo agrupadas em expostas ou controles (SMK E VEH respectivamente). Os pesos das mães foram obtidos em dois momentos: o primeiro momento foi logo antes do inicio da exposição (antes do acasalamento, que ocorre ao mesmo tempo em que elas começam a exposição na máquina da fumaça); e o segundo momento é executado nos mesmos dias em que ocorre a administração de etanol nos filhotes. Este segundo momento se inicia após o nascimento dos filhotes, no segundo dia de lactação (dia de lactação = DL), em DL2, e persiste em dias alternados até DL10.

Verificamos que a massa corporal das mães variou ao longo do período de exposição pós-natal e em função da exposição à fumaça de cigarros. Assim, analisando-se cada dia em

separado, notamos que já a partir de DL2, logo após o nascimento dos filhotes, já ocorre diferença de peso entre estes dois grupos. Esta diferença persistiu ao longo do tempo. Estes resultados sugerem que a diferença de massa corporal entre os grupos se estabeleceu durante a exposição da mãe na gestação.

4.1.2.2 Massa corporal da prole

Uma vez que a exposição ao etanol tem início somente em PN2, para verificarmos se a massa corporal dos animais no nascimento foi afetada pela exposição gestacional à fumaça de cigarros, realizamos uma análise inicial da massa dos filhotes antes da 1ª injeção de etanol (em PN2). Para esta análise, os filhotes foram divididos SMK e VEH. Neste caso, verificamos que mesmo antes do início a exposição ao etanol havia diferença de peso entre os grupos, o que sugere que, como ocorreu com a massa corporal das mães, a diferença de massa entre os grupos nos filhotes se estabeleceu durante a gestação.

A análise do ganho de massa corporal ao longo do período de exposição pós-natal, separando os animais nos quatro grupos de exposição (VEH, SMK, ETOH e SMK+ETOH) demonstrou que os grupos expostos a fumaça tiveram uma redução significativa do ganho de massa. Este efeito não se alterou ao longo dos dias de exposição pós-natal. Desde DL2 até o DL10 estes animais apresentaram massa reduzida em comparação a aqueles não expostos, embora tenha ocorrido aumento de massa com o passar do tempo. Após a interrupção da exposição a fumaça do cigarro, o ganho de peso se normalizou de forma a não ocorrer mais diferenças significativas entre os grupos em PN30.

A exposição pré-natal ao tabaco representa uma importante causa de desnutrição gestacional (Eskenazi et al., 1995) e tem sido descrita uma correlação inversa entre os níveis sanguíneos maternos de cotinina e o peso no nascimento (Ivorra et al., 2014). Ivorra e colaboradores (2014) descreveram que as crianças com exposição à fumaça do tabaco moderada têm uma diminuição de cerca de 250 g (10%) da massa corporal. Na mesma direção, em nosso modelo animal, os filhotes apresentam baixo peso ao nascer (cerca de 10% menor) e apresentaram menor ganho de massa corporal durante a exposição pós-natal quando comparados aos controles. Na verdade, progenitoras expostas à fumaça de cigarro apresentam uma massa corporal reduzida e não mostraram aumento no peso corporal durante o período de lactação. Vários mecanismos tem sido propostos para explicar os efeitos do tabagismo sobre a

massa corporal e a maioria dos efeitos parece ser mediada pela nicotina (para revisão: Audrain-McGovern & Benowitz, 2011). Seus efeitos incluem aumento do gasto energético por meio de ações simpatomiméticas e supressão da ingestão de alimentos pelo aumento das ações da leptina no hipotálamo. Curiosamente, nossos dados demonstraram que a exposição camundongos machos ao fumo do tabaco durante o desenvolvimento tornam-se mais pesados na idade adulta quando comparado com o grupo controle. Em geral, este efeito tardio sobre a composição corporal tem sido bem documentada em estudos epidemiológicos e tem sido associado com a exposição precoce à nicotina (Oliveira et al., 2010; Santos-Silva et al., 2011; Gao et al, 2005;. Chen e Kelly, 2005). Diferenças entre sexo e idade na manifestação da obesidade provocada pela nicotina observada na literatura pode ser atribuída a diferenças entre cepas estudadas, modelos de administração e período de exposição à nicotina. Oliveira e seus colaboradores (2009) demonstraram que a exposição à nicotina durante a lactação em ratos programa hipotireoidismo na idade adulta que poderiam participar, pelo menos em parte, na fisiopatologia da obesidade provocada pela nicotina. Nosso modelo de exposição ao tabaco durante o desenvolvimento indicaram que camundongos machos poderia ser mais sensível a este efeito e corroboram a hipótese de que a exposição à fumaça de cigarro durante o desenvolvimento programa para a obesidade na vida adulta.

4.1.2 Efeitos da exposição à fumaça de cigarro e/ou etanol durante o desenvolvimento na susceptibilidade a nicotina

Os nAChRs são expressos em todo o SNC e podem atuar na modulação da transmissão sináptica de outros neurotransmissores, como a dopamina por exemplo. (Dajas-Bailador e Wonnacott, 2004). Em particular no estriato, a interação entre a sinalização colinérgica e dopaminérgica está envolvida nas respostas motoras e nas informações relacionadas à recompensa de drogas (Calabresi e colaboradores, 2006; Cragg, 2006). É aceito na literatura que esta estrutura é composta por uma região dorsal, que constitui a “via dopaminérgica mesoestriatal”, e uma região ventral que está associada a processos límbicos, sendo esta região conhecida com núcleo accumbens e forma a “via dopaminérgica mesolímbica”. A via mesoestriatal está envolvida na geração de movimentos e no aprendizado, enquanto a mesolímbica desempenha papel crucial nos efeitos de recompensa de inúmeras drogas de abuso, incluindo a nicotina (Laviolette e van der Kooy, 2004). A nicotina

pode ativar neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo e terminais dopaminérgicos pré-sinápticos no estriato, levando a liberação de dopamina e desta forma modular o controle dopaminérgico sobre a atividade locomotora e sobre os processos de recompensa (Calabresi e colaboradores, 1989; Picciotto e colaboradores, 1998; Pidoplichko e colaboradores, 1997). Desta forma, a mudança de atividade locomotora espontânea pode ser um indicador comportamental da atividade dopaminérgica destas vias centrais e, assim, uma ferramenta no estudo dos efeitos das drogas psicoestimulantes, como a nicotina. No presente estudo, a exposição a nicotina só foi capaz de gerar aumento da atividade locomotora nos animais controles durante a adolescência, sugerindo que esta idade é mais sensível aos efeitos agudos desta droga de forma a corroborar que a adolescência representa um período de vulnerabilidade (Slotkin, 2002).

De maneira interessante, este efeito de aumento na atividade locomotora variou em função da exposição prévia a fumaça do cigarro ou etanol. A administração isolada destas substâncias no desenvolvimento também causou um efeito de ambulação nos animais adolescentes, no entanto, na exposição conjugada de ambas a drogas o aumento da ambulação não foi significante, sugerindo que exposição conjugada reduziu a sensibilidade a exposição aguda a nicotina nesta idade. Durante a idade adulta, somente os animais expostos a fumaça de cigarro durante o desenvolvimento apresentaram aumento na atividade locomotora por resposta aguda a nicotina. Este resultado indica que a exposição a fumaça de cigarro durante o desenvolvimento ampliam o período de vulnerabilidade aos efeitos agudos da nicotina observados adolescência para o início da vida adulta. Este resultado corrobora as evidências epidemiológicas que indicam a exposição de fumaça de cigarro durante a gestação predispõe ao uso tardio subsequente (Kandel et al. 1994; Oncken et al. 2004). De modo geral, a nicotina promoveu um efeito ansiogênico durante a adolescência. A exposição prévia a fumaça de cigarros apresentou aumento no tempo de permanência dos animais machos no centro do campo aberto durante a adolescência, podendo indicar uma dificuldade desses animais na capacidade de avaliação de risco. Além disso, a nicotina reverteu completamente esse aumento no tempo de centro, sugerindo uma forte resposta ansiogênica da nicotina neste grupo.

Um dos modelos mais utilizados para avaliar os efeitos de recompensa de drogas é o teste de condicionamento por lugar (CPP) (Le Foll e Goldberg, 2006; O'Dell e Khroyan, 2009). No modelo de CPP utilizado, o condicionamento por lugar ficou evidente somente em fêmeas adolescentes expostas à fumaça de cigarro e ao etanol durante o desenvolvimento. Este resultado sugere, de forma geral, que fêmeas adolescentes são mais suscetíveis aos

efeitos da nicotina na geração de condicionamento e que a exposição de cada droga em separado (fumaça de cigarros ou etanol) durante o desenvolvimento aumentam a susceptibilidade exposição à nicotina durante a adolescência.

Trabalhos anteriores demonstraram que o modelo de administração de etanol utilizado no presente estudo produz níveis sanguíneos de etanol máximos de aproximadamente $174,5 \pm 3,5$ mg/dL uma hora após a injeção (Filgueiras et al., 2009). Estes níveis de etanol estão dentro de uma faixa que um feto humano pode ser exposto após a ingestão materna de uma dose de álcool de moderada à alta (Eckardt et al., 1998). Além disso, 90% dos animais injetados com etanol sobrevivem até a idade dos testes (Filgueiras et al., 2009, Nunes et al., 2011). A dose escolhida para a administração de etanol e principalmente o período de administração podem ter induzido o aumento de susceptibilidade ao condicionamento pela nicotina em camundongos fêmeas adolescentes, contribuindo também para justificar as diferenças dos resultados observadas em ratos por Matta e Elberger (2007), onde não foi observado um aumento da auto administração de nicotina em animais expostos ao etanol isoladamente em baixas doses durante toda a gestação. No entanto, os resultados observados aqui estão de acordo com dados epidemiológicos que constatarem que a exposição alcoólica fetal induz predisposição para o uso e abuso de nicotina, álcool e dependência de drogas (Barbier et al. 2009; Baer et al, 1998, 2003;. Yates et al., 1998).

Embora alguns autores terem demonstrado com sucesso efeitos de aumento da auto administração de nicotina em ratos machos, (Brower et al. 2002; Fu et al. 2001; Kosten and Ambrosio 2002), o presente estudo utilizou camundongos para sua execução, o que pode explicar os resultados antagônicos entre os estudos, uma vez que diferenças entre espécies já foi reportado para o consumo de nicotina (Robinson et al., 1996). Porém, os nossos resultados foram mais evidentes em fêmeas, corroborando alguns estudos de auto administração que observaram maior propensão para as fêmeas (Matta e Elberger, 2007; Chen et al. 2007), sendo também análogo com o relatado para a população humana (Kandel et al., 1994; Oncken et al.; 2004; Roberts et al., 2005). Vale ressaltar que não parece haver um real consenso na literatura quanto ao efeito de gênero na prole de mães fumantes quanto a possibilidade de serem mais suscetíveis aos efeitos da nicotina. Além dos trabalhos que reportam maior susceptibilidade em filhas, outros estudos tem reportado que não há diferenças entre gêneros (Buka et al., 2003; Cornelius et al., 2000), enquanto outro artigo reportou que filhas progridem mais rapidamente para usuárias diárias enquanto que a experimentação precoce é realizada mais por filhos homens (Oncken et al. 2004).

Diferente dos modelos de exposição usualmente escolhidos para checar efeitos do tabagismo materno na prole, que fazem uso somente de nicotina, este trabalho contemplou não somente a nicotina, mas também todas as outras substâncias presentes na fumaça do tabaco. Os dados apresentados para o paradigma da preferencia condicionada por lugar indicam que estes modelos de exposição melhoram a aquisição do condicionamento por nicotina. Estes dados estão de acordo com diversos estudos epidemiológicos que indicam que os filhos de mulheres tabagistas ou alcoolistas são suscetíveis a aquisição de tabagismo (Buka et al., 2003; Cornelius et al., 2000; Kandel et al., 1994; Oncken et al., 2004; Roberts et al., 2005; Baer et al., 1998, 2003; Yates et al., 1998). Embora o aumento de susceptibilidade tardia à nicotina não tenha sido encontrado em modelos de exposição pre-natal de nicotina (Matta e Elberger, 2007), o presente modelo, envolvendo exposição a fumaça de cigarro, foi capaz de observar. Tem sido discutido recentemente a influencia dos efeitos dos outros componentes encontrados na folha do tabaco na instauração e manutenção da dependência (Clemens et al., 2009), principalmente em detrimento de os efeitos de recompensa da nicotina encontrado em estudos experimentais em laboratório não condizerem o enorme contingente de tabagistas encontrado em todo o mundo (Bespalov et al., 1999; Manzardo et al., 2002). Embora muito progresso tenha sido feito no desenvolvimento de terapias farmacológicas para tratar a dependência do tabaco, a maioria das tentativas por parte dos usuários de tabaco são geralmente mal sucedida na manutenção da abstinência, mesmo após várias tentativas de cessação (Benowitz, 2010). Muitos dos agentes terapeuticos para tratar o tabagismo disponíveis atualmente se concentram na substituição da nicotina do tabaco (adesivos de nicotina, goma, spray nasal, pastilhas), ou em receptores nicotínicos de acetilcolina (vareniclina). A bupropiona, que inibe a reabsorção de monoaminas, também tem efeitos nicotínicos diretos (Lukas et al., 2010).

Interessantemente, no presente estudo foi constatado somente uma tendência no aumento de susceptibilidade ao condicionamento pela nicotina para o grupo que recebeu a exposição combinada, indicando que a combinação destas duas drogas reduziu a sensibilidade das fêmeas à nicotina para este paradigma. Outra possibilidade de explicar este efeito é que, o teste do CPP requer uma associação dos efeitos da droga ao ambiente em que ela foi administrada, sendo assim um teste que envolve aprendizado e memória. Foi demonstrado que ao etanol durante o desenvolvimento produz alterações na memória espacial na adolescência e que estes prejuízos estão associados à memória de longo prazo (Filgueiras et al., 2010). Como as fêmeas adolescentes expostas somente ao etanol durante o desenvolvimento apresentaram condicionamento no CPP, corroborando estudo anterior em

ratos (Rogers et al., 2004), a possibilidade de que possíveis alterações na memória causada pela etanol tenham influenciado no teste do CPP só seriam plausíveis se exposição combinada a fumaça de cigarro intensificasse o prejuízo. Embora estudos anteriores tenham revelado que a exposição em útero de nicotina e etanol em conjunto levam a uma maior pré-disposição para os efeitos de recompensa de nicotina (Matta e Elberger, 2007; 2014), para os paradigmas de recompensa avaliados neste trabalho a dupla exposição não foi capaz de demonstrar efeitos significativos. Vale mencionar que a ênfase dada nos trabalhos que apontam aumento de susceptibilidade a nicotina nos animais expostos durante o desenvolvimento a ambas as drogas foram o início do período de aquisição voluntária e a manutenção ou retomada do comportamento de aquisição da droga, comportamentos estes que não se demonstraram replicáveis para a nicotina em experimentos com ratos naïve (Brower et al. 2002; Fu et al. 2001; Valentine et al. 1997). Também é possível especular que outros componentes, além da nicotina, presentes na fumaça de cigarro podem interagir com os efeitos do álcool durante o desenvolvimento diminuindo a resposta de aumento de susceptibilidade à nicotina observada para cada droga separadamente.

4.2 Etapa 2 _ Universidade de Copenhagen – Estudos Eletrofisiológicos

A compreensão de como o álcool é capaz de modificar neuroquimicamente neurônios em regiões distintas do cérebro é crucial para entender seus efeitos no comportamento, principalmente aqueles relacionados a dependência de drogas abuso, uma vez que esta pratica representa problema de saúde publica atingindo milhões de pessoas em todo o mundo. A compreensão dos mecanismos envolvidos com este problema, bem como os fatores que o influenciam são de extrema importância. Dentre os diversos fatores que conduzem o individuo ao vicio, a exposição à nicotina durante o desenvolvimento aparece como de risco importante. Desta forma, esta etapa do estudo foi destinada a avaliar os efeitos de uma aplicação aguda de etanol em neurônios do núcleo tegumentar lateral (LDT), uma área recentemente descrita como sendo capaz de desempenhar um papel importante nos comportamentos associados a dependência de drogas, de animais que forma expostos ou não a nicotina durante a gestação.

4.2.1 Efeitos do etanol em eventos espontâneos

Inicialmente, foi aplicada uma perfusão de ACSF contendo etanol a 40mM para determinar as ações eletrofisiológicas sobre os neurônios de LDT sobre a taxa global de disparos. Nesses experimentos, nós não bloqueamos qualquer transmissão sináptica, e, portanto, avaliou-se o impacto do etanol sobre os circuitos que regulam as taxas de disparos dos neurônios. Desta forma encontramos uma redução significativa na frequência de disparos em decorrência desta aplicação em células dos animais que foram submetidos ao tratamento controle com sacarina. Com isso os experimentos se estenderam para os animais que foram expostos à nicotina pré-natal e interessante, apesar de termos encontrado redução na frequência de disparos, esta não foi significativa. Este resultado sugere que houve alterações na maquinaria celular no decorrer no desenvolvimento em decorrência da exposição à nicotina. Tais alterações na frequência de disparos demonstrou-se ter sido principalmente por reduções em eventos excitatórios, como foi demonstrado por experimentos posteriores a este.

Junto com as alterações na frequência, foi constatado também um aumento na corrente basal aplicada às células para que a manutenção da voltagem permanecesse em -60mV. Este resultado indica que o álcool está interferindo no potencial de repouso de membrana das células. Porém, este aumento foi mais forte em células de animais EPN. Já foi demonstrado anteriormente que o etanol é capaz de atuar em receptores GABA-A extra-sinápticos, presentes no corpo celular (Jia et al., 2008), e desta forma alterar a condutância que afeta o potencial de membrana em repouso, refletindo em alterações da corrente basal. Alterações destes parâmetros também já haviam sido reportadas em células de animais que haviam sido expostos à fumaça de tabaco no período pré-natal (Good et al., 2006) e, em decorrência disto, foi constatado uma maior amplitude de corrente ativa cationica quando comparada com a amplitude desta corrente em animais controle, o que também afeta o potencial de membrana em repouso. Esta corrente é uma corrente mista cationica ativada por uma hiperpolarização significativa da célula. Embora outro trabalho realizado em LDT (Christensen et al., 2014) não tenha encontrado discrepâncias em comparações feitas em células de animais pré-expostos à nicotina e células controle para este quesito, estas avaliações foram restritas a células colinérgicas, e não há como dizer que todas as células analisadas no presente estudo são de natureza colinérgica. Células glutamatérgicas e GABAérgicas também fazem parte deste núcleo e podem estar interferindo nos resultados encontrados e desta forma explicam que os resultados que estão sendo observados neste trabalho indicam que tanto o etanol

quando a exposição pré-natal à nicotina são capazes de alterar as condutâncias que afetam o potencial de membrana em repouso.

4.2.2 Etanol e Eventos Excitatórios

Para estes experimentos, as transmissões inibitórias GABAérgicas ou via glicina (realizados com a presença dos bloqueadores ST e SR respectivamente), foram bloqueadas.

Estes experimentos foram conduzidos na presença ou não de TTX, quando o TTX não estava presente, permitia-se a geração de potenciais de ação que fossem dependentes de redes de comunicações neuronais. A presença de TTX inibia a geração destes potenciais.

A aplicação de etanol na cuba de registro não induziu efeito na frequência das transmissões sinápticas excitatórias glutamatérgicas quando as redes de comunicação neuronais ainda estavam intactas (sEPSC). Porém, em presença de TTX, o observado foi uma redução da frequência de mEPSC, sem efeitos para a amplitude, o que sugere uma diminuição da transmissão glutamatérgica em muitas regiões do cérebro envolvidas no abuso desta droga, tais como o núcleo central da amígdala (CeA) (para revisão: Roberto et al., 2004). Tomados em conjunto, a não alteração da frequência de sEPSC induzida pelo etanol, juntamente à redução da frequência de mEPSC indicam que a atuação de etanol está em receptores localizados em terminais pré-sinápticos.

Embora em um estudo publicado recentemente que avaliou os efeitos do tratamento neonatal com nicotina em neurônios de LDT não tenham sido relatadas quaisquer alterações na frequência de sEPSC entre animais controle e animais que tenham sido expostos à nicotina durante o desenvolvimento (Christensen et al., 2014), nosso estudo demonstrou uma forte redução da frequência basal observada em células de animais tratados com nicotina no período pré-natal quando comparadas com células de animais tratados com sacarina no período pré-natal. Cabe mencionar que fatores como a idade do animal e o tipo celular são importantes para a determinação dos resultados. No presente estudo, os animais utilizados foram de idades entre 7 e 21 dias. Este fator é importante uma vez que já foi demonstrado que a composição de subunidades de nAChRs presentes em células de LDT se altera de acordo com a idade, o que influencia o grau de dessensibilização do receptor após a exposição a nicotina (Berridge, 1998). Adicionalmente, não identificamos o fenótipo celular, assim, estes

fatores podem estar interferindo nos dados aqui obtidos de modo a termos encontrado diferenças significativas que não foram identificadas anteriormente.

4.2.3 Etanol e eventos inibitórios

Para estes experimentos, as transmissões excitatórias vias receptores AMPA, kainato e NMDA, foram bloqueadas (realizados com a presença dos bloqueadores DNQX e AP-V).

Estes experimentos foram conduzidos na presença ou não de TTX, quando o TTX não estava presente, permitia-se a geração de potenciais de ação que fossem dependentes de redes de comunicações neuronais. A presença de TTX inibia a geração destes potenciais.

Apesar de já ter sido demonstrado em neurônios dopaminérgicos de VTA que o etanol é capaz de afetar as transmissões sinápticas mediadas por receptores GABA quando as redes de comunicação estão intactas (sIPSC) (Guan et al., 2012), e mesmo quando as redes são inibidas com a presença de TTX (mIPSC) (Thiele et al., 2008, 2011), neste trabalho não foram encontradas modificações significativas na frequência de sIPSC ou de mIPSC. A concentração de etanol aqui utilizada foi capaz de gerar somente um leve aumento da frequência, porém este aumento não chegou a ser significativo. Talvez o fato de termos utilizado uma concentração moderada de etanol, 40mM explique o fato de o aumento não ter sido tão expressivo. Além disso, trabalhos anteriores foram conduzidos em ratos e não em camundongos como foi o caso deste projeto.

As transmissões sinápticas GABAérgicas não foram afetadas, porém, as extra-sinápticas sim. Como dito anteriormente, o etanol modifica receptores GABA-A extra-sinápticos (Jia et al., 2008), e a exposição a fumaça de tabaco durante a gestação também é capaz de alterar as propriedades intrínsecas da membrana (Good et al., 2006), o que pode explicar as alterações encontradas na corrente basal nos estudos de mIPSC. O resultado interessante que foi encontrado nestes parâmetros foi que células de animais tratados com nicotina no período pré-natal apresentam um aumento da corrente basal em condições normais quando comparados com células de animais tratados com sacarinsacarinaa no período pré-natal. Este influxo anormal de íons deixa a célula em um estado de hiperpolarização, sendo que, quando o TTX não está presente, com o estabelecimento da rede de comunicação neural, o gradiente iônico se reestabelece. Este estado de hiperpolarização das células de animais tratados com nicotina no período pré-natal pode explicar o motivo de elas não terem

sido afetadas tal como as células de animais tratados com sacarina no período pré-natal pelo etanol para este parâmetro. A exposição ao etanol nestas células parece estar atuando tal como o TTX, restabelecendo o gradiente iônico.

Foi demonstrado que células colinérgicas de animais que haviam sido expostos à nicotina no desenvolvimento apresentam um atraso para a obtenção do pico de despolarização bem como uma demora na repolarização, o que provavelmente contribuiu para o potencial de ação mais amplo observado (Christensen et al., 2014). O estado de hiperpolarização identificado em células de animais tratados com nicotina no período pré-natal em conjunto com os resultados obtidos no trabalho anterior (Christensen et al., 2014) podem explicar efeitos observados na amplitude tanto de experimentos de sIPSC tanto para experimentos de mIPSC. A hiperpolarização basal de células de animais tratados com nicotina no período pré-natal pode estar influenciando na recuperação após um evento de despolarização, aumentando seu tempo de forma a observarmos potenciais de ação mais amplos. Embora, tal como observado por Li e colaboradores (2013), em células de animais tratados com sacarina no período pré-natal o observado foi uma redução da amplitude em virtude da exposição ao etanol. Na ausência de TTX, as células de animais tratados com nicotina no período pré-natal que tem seus gradientes iônicos normalizados devido a ausência de rede neural, estas células agiram tal como células de animais tratados com sacarina no período pré-natal e reduziram suas amplitudes em virtude da ação do etanol.

Um ponto importante a se abordado nestes estudos é que a exposição pré-natal e/ou pós-natal recente à nicotina regula transitoriamente nAChRs (causando tanto supra- quanto infra-regulação) (Pastrakuljic et al., 1998; Suzuki et al., 1974; Slotkin et al., 1987; Vincent e Kimura, 1992). Apesar de não ter sido especificamente examinado em LDT, estas alterações induzidas em nAChRs foram encontradas em várias regiões do cérebro, incluindo o tronco cerebral, onde o LDT está localizado (Suzuki et al., 1974; Shacka e Robinson, 1998), indicando que as alterações de nAChRs funcionais dentro do LDT em resposta a exposição precoce à nicotina podem ocorrer. Já foi demonstrado anteriormente que a nicotina induz correntes de despolarização (que também pode significar correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas - sEPSC) em neurônios LDT após a estimulação pós-sináptica de nAChRs (Shen e Yakel et al., 2009; Ishibashi et al., 2009; Pauly et al., 2004) e que isto está relacionado com a idade do animal. No entanto, a nicotina não foi capaz de induzir sEPSC em células de animais que haviam sido previamente expostas à nicotina com idade de 7 a 15 dias. A reexposição a nicotina foi capaz de provocar um leve aumento na frequência de sEPSC, embora não significativa, e aumento significativo da amplitude em animais com idades de 11

a 21 dias quando comparado com amplitudes induzidas em animais controle da mesma idade. (Christensen et al., 2014).

A este conjunto de dados, acrescentamos o fato de que o etanol exerce forte influencia em praticamente todos os canais iônicos dependentes de neurotransmissor (Dopico e Lovinger, 2009; Harris et al., 2008) inclusive receptores do sistema colinérgico (Grant, 1994), especialmente nicotínicos (Aistrup et al., 1999, Ribeiro e Carvalho et al., 2008, 2009), e que suas ações fisiológicas dependem do núcleo cerebral em que os resultados estão sendo obtidos (Li et al., 2013; Theile et al., 2011). Assim, determinar as ações neuronais resultantes da interação de etanol e da exposição pré-natal à nicotina é uma tarefa de enorme complexidade, especialmente que neste estudo fatores como a ontogenia, o núcleo cerebral em que os resultados estão sendo obtidos, o tipo celular em os registros estão sendo efetuados serão puderam ser levados em consideração.

CONCLUSÕES

Etapa 1 _ Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Estudos Comportamentais

Camundongos adolescentes são mais sensíveis aos efeitos da nicotina tanto no teste de campo aberto quanto no teste de preferência condicionada por lugar.

Somente em animais previamente expostos a fumaça de cigarro o aumento de atividade locomotora induzida pela nicotina foi mantida na idade adulta.

A exposição a fumaça de cigarro ou etanol durante o período que corresponde a gestação em humanos aumenta a susceptibilidade a nicotina no teste de preferência condicionada por lugar, sendo que camundongos adolescentes fêmeas são mais sensíveis aos efeitos da nicotina quando comparadas com machos adolescentes e animais adultos.

Apesar da nicotina ter sido capaz de aumentar a atividade locomotora nos animais adolescentes controle, previamente expostos a fumaça e expostos ao etanol, a exposição combinada a fumaça de cigarro e etanol não causou aumento na susceptibilidade a nicotina em adolescentes e adultos tanto no campo aberto quanto no teste de preferência condicionada por lugar.

Etapa 2 _ Universidade de Copenhagen – Estudos Eletrofisiológicos

A exposição a nicotina no período pré-natal reduz os eventos pós-sinápticos excitatórios e o potencial de repouso de células do LDT. A exposição aguda ao etanol no período pós-natal não tem efeitos sobre os impulsos inibitórios, mas inibe inputs excitatórios em neurônios presentes no núcleo tegumental laterodorsal através de um mecanismo pré-sináptico. Estes dados indicam que efeitos comportamentais induzidos pelo etanol podem não estar ocorrendo através de LDT.

REFERÊNCIAS

1. Abdullah Al Mamun, Frances V O'Callaghan, Rosa Alati, Michael O'Callaghan, Jake M Najman, Gail M Williams, William Bor. Does maternal smoking during pregnancy predict the smoking patterns of young adult offspring? A birth cohort study. *Tobacco Control*. 15:452–457, 2006.
2. Abel, E. L. Smoking during pregnancy: a review of effects on growth and development of offspring. *Hum Biol*. 52:593, 1990.
3. Abernathy, J. R., Greenberg, B. G., Wells HB et al. Smoking as a independent variable in a multiple regression analysis upon birth weight and gestation. *Am J Pub Health*. 56:626, 1966.
4. Abreu-Villaça Y et al. Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Neuropsychopharmacology*, 28: 1935-1949, 2003.
5. Abreu-Villaça Y, Cavina CC, Ribeiro-Carvalho A, Correa-Santos M, Naiff VF, Filgueiras CC, Manhães AC. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol during adolescence leads to short- and long-term modulation of anxiety-like behavior. *Drug Alcohol Depend*. Nov 1;133(1):52-60, 2013b
6. Abreu-Villaça Y, de Carvalho Graça AC, Ribeiro-Carvalho A, Naiff Vde F, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nicotine Tob Res*. Jul;15(7):1211-21, 2013a
7. Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhães AC. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res*. 221(2):367-78, 2010a.
8. 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. *Behavioural Brain Research*. 181: 136-146, 2007.
9. Abreu-Villaça Y, Nunes F, Queiroz-Gomes FE, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined Exposure to Nicotine and Ethanol in Adolescent Mice Differentially Affects Anxiety Levels during Exposure, Short Term and Long Term Withdrawal. *Neuropsychopharmacology*. 33: 599-610, 2008.
10. Abreu-Villaça Y, Seidler F, Slotkin TA. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in ndolescence? *Neuropsychopharmacol*. 29: 1440-50, 2004a.
11. 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*. 29: 879-890, 2004b.

12. Abreu-Villaça Y1, Filgueiras CC, Guthierrez M, Medeiros AH, Mattos MA, Pereira Mdos S, Manhães AC, Kubrusly RC. 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.* 12(7):776-80, 2010.
13. Acheson SK, Ross EL, Swartzwelder HS. Age-independent and dose-response effects of ethanol on spatial memory in rats. *Alcohol.* 23: 167-175, 2001.
14. Aistrup GL, Marszalec W, Narahashi T. Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol.* 1999 Jan;55(1):39-49.
15. Al Mamun A, O'Callaghan FV, Alati R, O'Callaghan M, Najman JM, Williams GM, Bor W. Does maternal smoking during pregnancy predict the smoking patterns of young adult offspring? A birth cohort study. *Tob Control.* 2006 Dec;15(6):452-7
16. Alati R, Al Mamun A, Williams GM, O'Callaghan M, Najman JM, Bor W. In utero alcohol exposure and prediction of alcohol disorders in early adulthood: a birth cohort study. *Arch Gen Psychiatry.* 2006 Sep;63(9):1009-16.
17. Alderson HL1, Latimer MP, Winn P. Intravenous self-administration of nicotine is altered by lesions of the posterior, but not anterior, pedunclopontine tegmental nucleus. *Eur J Neurosci.* 2006 Apr;23(8):2169-75.
18. Alderson HL, Latimer MP, Blaha CD, Phillips AG, Winn P. An examination of d-amphetamine self-administration in pedunclopontine tegmental nucleus-lesioned rats. *Neuroscience.* 2004;125(2):349-58.
19. Alikunju S, bdul Muneer PM, Zhang Y, Szlachetka AM, Haorah J. The inflammatory footprints of alcohol-induced oxidative damage in neurovascular components. *Brain Behav.Immun.* 2011; 25 Suppl 1: S129-S136.
20. Allen Brain Atlas (Disponível em: <http://mouse.brainmap.org/search/show;page num=0&page size =23&no paging=false&exact match=false&search term=chrna6&search type=gene>). Acessado em: 17 de julho de 2014.
21. Allen SS, Bade T, Hatsukami D, Center B. Craving, withdrawal, and smoking urges on days immediately prior to smoking relapse. *Nicotine Tob Res* 10:35-45. 2008.
22. Altman J, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 301:365-381, 1990.
23. Andrucci GL1, Archer RP, Pancoast DL, Gordon RA. The relationship of MMPI and Sensation Seeking Scales to adolescent drug use. *J Pers Assess.* 1989 Summer;53(2):253-66.
24. Aramakis VB, Metherate R. Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience*, 18: 8485-95. 1998.

25. Aramakis VB¹, Hsieh CY, Leslie FM, Metherrate R. A critical period for nicotine-induced disruption of synaptic development in rat auditory cortex. *J Neurosci*. 2000 Aug 15;20(16):6106-16.
26. Araujo DM¹, Lapchak PA, Collier B, Quirion R. Characterization of N-[³H]methylcarbamylocholine binding sites and effect of N-methylcarbamylocholine on acetylcholine release in rat brain. *J Neurochem*. 1988 Jul;51(1):292-9.
27. Areechon W¹, Punnotok J. Smoking cessation through the use of nicotine chewing gum: a double-blind trial in Thailand. *Clin Ther*. 1988;10(2):183-6.
28. Arnold MM, Loughlin SE, Belluzzi JD, Leslie FM. Reinforcing and neural activating effects of norharmane, a non-nicotine tobacco constituent, alone and in combination with nicotine. *Neuropharmacology* 85 (2014) 293e304, 2014.
29. Assmussen I. Ultrastructure of the human placenta at term. Observations on placenta from newborn children of smoking and non smoking mothers. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 56:119. 1977.
30. Audrain-McGovern J, Benowitz NL. Cigarette smoking, nicotine, and body weight. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Jul;90(1):164-8.
31. Azam L, Winzer-Serhan U, Leslie FM. Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience*. 2003;119(4):965-77.
32. Baer JS, Barr HM, Bookstein FL, Sampson PD, Streissguth AP. Prenatal alcohol exposure and family history of alcoholism in the etiology of adolescent alcohol problems. *J Stud Alcohol*. 1998 Sep;59(5):533-43..
33. Baer JS, Sampson PD, Barr HM, Connor PD, Streissguth AP. A 21-year longitudinal analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on young adult drinking. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 Apr;60(4):377-85.
34. Balachova T, Bonner B, Chaffin M, Bard D, Isurina G, Tsvetkova L, Volkova E. Women's Alcohol Consumption and Risk for Alcohol-Exposed Pregnancies in Russia. *Addiction*. 107(1):109-17, 2011.
35. Balfour, D. J., Fagerstrom, K. O. Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders. *Pharmacol Therap*. 72:51. 1996.
36. Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009; 106: 14108-14113.
37. Barbier E, Houchi H, Warnault V, Pierrefiche O, Daoust M, Naassila M. Effects of prenatal and postnatal maternal ethanol on offspring response to alcohol and psychostimulants in long evans rats. *Neuroscience*. 161(2):427-40, 2009.
38. Bardo MT, Green TA, Crooks PA, Dwoskin LP. Nornicotine is self-administered intravenously by rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Oct;146(3):290-6.

39. Basta PV, Basham KB, Ross WP, Brust ME, Navarro HA. Gestational nicotine exposure alone or in combination with ethanol down-modulates offspring immune function. *Int J Immunopharmacol.* 22(2):159-69, 2000.
40. Batel P, Pessione F, Maître C, Rueff B. Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. *Addiction.* 1995 Jul;90(7):977-80
41. Batstra L, Hadders-Algra M, Neeleman J. Effect of antenatal exposure to maternal smoking on behavioural problems and academic achievement in childhood: prospective evidence from a Dutch birth cohort. *Early Hum Dev.* 2003 Dec;75(1-2):21-33.
42. Bayer SA. [3H]Thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp. Brain Res.* 50: 329-340, 1983.
43. Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology.* 14:83–144, 1993.
44. Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science.* 216: 890-892, 1982.
45. Becker HC, az-Granados JL, Randall CL. Teratogenic actions of ethanol in the mouse: a minireview. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1996; 55: 501-513.
46. Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med* 2010;362:2295–303.
47. Benowitz NL. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med Clin North Am.* 1992 Mar;76(2):415-37. Review.
48. Benowitz, N. L. Pharmacology of nicotine addiction and therapeutics. *Ann Rev Pharmacol. Toxicol.* 36:597. 1996.
49. Benowitz, NL. Nicotine safety and toxicity. Ed Oxford Univ Press New York, 1998.
50. Berlin, I., Anthenelli, R. Monoamine oxidases and tobacco smoking. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 4 (1), 33e42, 2001.
51. Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 1998; 21, 13–26.
52. Bespalov A, Lebedev A, Panchenko G, Zvartau E. Effects of abused drugs on thresholds and breaking points of intracranial self-stimulation in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 1999;9:377–83.
53. Bhatara V, Loudenberg R, Ellis R. Association of attention deficit hyperactivity disorder and gestational alcohol exposure: an exploratory study. *J Atten.Disord.* 2006; 9: 515-522.
54. Bittoun R. Recurrent aphthous ulcers and nicotine. *Med J Aust.* 1991 Apr 1;154(7):471-2.

55. Blackson TC, Tarter RE. Individual, family, and peer affiliation factors predisposing to early-age onset of alcohol and drug use. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994 Aug;18(4):813-21.
56. Blaha CD, Allen LF, Das S, Inglis WL, Latimer MP, Vincent SR, Winn P. Modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens after cholinergic stimulation of the ventral tegmental area in intact, pedunculo pontine tegmental nucleus-lesioned, and laterodorsal tegmental nucleus-lesioned rats. *J Neurosci.* 1996 Jan 15;16(2):714-22.
57. Block J, Block J, Keyes S. 1988. Longitudinally foretelling drug usage in adolescence: early childhood and personality and environmental precursors. *Child Development* 59:336–355.
58. Blomqvist O, Söderpalm B, Engel JA. Ethanol-induced locomotor activity: involvement of central nicotinic acetylcholine receptors? *Brain Res Bull.* 1992 Aug;29(2):173-8.
59. Bluter, N. R., Alberman, R. D. Perinatal problems. The Second Report British Perinatal Mortality Survey. Londres. 1969.
60. Bobo JK, Gilchrist LD, Schilling RFN, Noach B, Schinke SP. Cigarette smoking cessation attempts by recovering alcoholics. *Addict Behav.* 12: 209–215, 1987.
61. Bouyer, J. Risk factors for ectopic pregnancy. A comprehensive analysis based on a large case-control. Population based study in France. *Am J Epidemiol.* 157:185. 2003.
62. Brebner K, Phelan R, Roberts DC. Effect of baclofen on cocaine self-administration in rats reinforced under fixed-ratio 1 and progressive-ratio schedules. *Psychopharmacology (Berl).* 2000 Feb;148(3):314-21.
63. Brenhouse HC, Sonntag KC, Andersen SL. Transient D1 dopamine receptor expression on prefrontal cortex projection neurons: relationship to enhanced motivational salience of drug cues in adolescence. *J Neurosci.* 2008 Mar 5;28(10):2375-82.
64. Brennan KA, Putt F, Truman P. Nicotine-, tobacco particulate matter- and methamphetamine-produced locomotor sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 228:659-672, 2013.
65. Brennan PA, Grekin ER, Mortensen EL, Mednick SA. Relationship of maternal smoking during pregnancy with criminal arrest and hospitalization for substance abuse in male and female adult offspring. *Am J Psychiatry.* 2002 Jan;159(1):48-54.
66. Broide RS, O'Connor LT, Smith MA, Smith JA, Leslie FM. Developmental expression of alpha 7 neuronal nicotinic receptor messenger RNA in rat sensory cortex and thalamus. *Neuroscience.* 1995 Jul;67(1):83-94.
67. Brooks JM, Doucette W, Sorofman B. Factors affecting bargaining outcomes between pharmacies and insurers. *Health Serv Res.* 1999 Apr;34(1 Pt 2):439-51.

68. Brower VG, Fu Y, Matta SG, Sharp BM (2002) Rat strain differences in nicotine self-administration using an unlimited access paradigm. *Brain Res* 930:12–20
69. Bruijnzeel AW, Ford J, Rogers JA, Scheick S, Ji Y, Bishnoi M, Alexander JC. Blockade of CRF1 receptors in the central nucleus of the amygdala attenuates the dysphoria associated with nicotine withdrawal in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012
70. Buisson B, Bertrand D. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *The journal of neuroscience*, 21:1819-29. 2001.
71. Buisson B, Bertrand D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends in pharmacological sciences*, 23:130-6. 2002.
72. Buka SL, Shenassa ED, Niaura R. Elevated risk of tobacco dependence among offspring of mothers who smoked during pregnancy: a 30-year prospective study. *Am J Psychiatry* 2003;160:1978–84.
73. Burd L, Klug MG, Martsolf JT, Kerbeshian J. Fetal alcohol syndrome: neuropsychiatric phenomics. *Neurotoxicol.Teratol.* 25: 697-705, 2003.
74. Butler, N. R., Roldstein, H., Ross, E. M. Cigarette smoking in pregnancy: its influence on birth weight and perinatal mortality. *Brit Med J.* 2:127. 1972.
75. Button TM, Maughan B, McGuffin P. The relationship of maternal smoking to psychological problems in the offspring. *Early Hum Dev.* 83: 727–732, 2007.
76. Caprara G, Cinanni V, D'Imperio G, Passerini S, Renzi P, Travaglia G. 1985. Indicators of impulsive aggression: Present status of research on irritability and emotional susceptibility scales. *Personality and Individual Differences* 6:665–674.
77. 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 May;289(2):774-80.
78. Carmelli D, Swan GE, Robinette D. The relationship between quitting smoking and changes in drinking in World War II veteran twins. *J Substance Abuse.* 5:103–116, 1993.
79. Carmelli D, Swan GE, Robinette D, Fabsitz R. Genetic influence on smoking--a study of male twins. *N Engl J Med.* 1992 Sep 17;327(12):829-33.
80. Carmines EL, Gaworski CL, Faqi AS, Rajendran N. In utero exposure to 1R4F reference cigarette smoke: evaluation of developmental toxicity. *Toxicol Sci.* 2003 Sep;75(1):134-47.
81. 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(4):323-35.

82. Cavalcante, T. Programa Nacional de Controle do Tabagismo. Avanços e Desafios. CONPREV. Instituto Nacional de Câncer. 2001.
83. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Alcohol use among pregnant and nonpregnant women of childbearing age - United States, 1991–2005. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Morb Mortal Wkly Rep. 58: 529-532. 2009
84. Centers for Disease Control and Prevention. Current Cigarette Smoking Among Adults—United States, 2005–2012.. Morbidity and Mortality Weekly Report 2014;63(02):29–34 [accessed 2014 Feb 14]
85. Chan WK, Wong PT, Sheu FS. Frontal cortical alpha7 and alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in working and reference memory. *Neuropharmacology*, 52: 1641-1649. 2007.
86. Chen D, Patrick JW. The alphabungarotoxin- binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem* 272:24024–24029. 1997.
87. Chen H, Hiler KA, Tolley EA, Matta SG, Sharp BM. Genetic factors control nicotine self-administration in isogenic adolescent rat strains. *PloS One*. 7:e44234, 2012.
88. Chen H, Matta SG, Sharp BM (2007) Acquisition of nicotine self-administration in adolescent rats given prolonged access to the drug. *Neuropsychopharmacol* 32:700–709
89. Chen H, Parker SL, Matta SG, Sharp BM. Gestational nicotine exposure reduces nicotinic cholinergic receptor (nAChR) expression in dopaminergic brain regions of adolescent rats. *Eur J Neurosci* 22:380–388. 2005.
90. Chen WJ & Kelly RB 2005 Effect of prenatal or perinatal nicotine exposure on neonatal thyroid status and offspring growth in rats. *Life Sciences* 76 1249–1258.
91. Chen J, Millar WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep*. 1998 Spring;9(4):39-46(Eng); 39-48(Fre).
92. 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 Jan;85(1):41-7.
93. Chistyakov V, Patkina N, Tamminen A, Talka R, Salminen O, Belozertseva I, Galankin T, Tuominen R, Zvartau E. Nicotine exposure throughout early development promotes nicotine self-administration in adolescent mice and induces long-lasting behavioural changes. *Eur J Pharmacol*. 2010 Aug 25;640(1-3):87-93.
94. Chotro MG, Arias C, Laviola G. Increased ethanol intake after prenatal ethanol exposure: studies with animals. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31(2):181-91. Epub 2006 Sep 28. Review.
95. Christensen MH, Ishibashi M, Kohlmeier KA (2012) Christensen MH, Ishibashi M and Kohlmeier KA (2012) Is nicotine more exciting in cholinergic and non-cholinergic neurones in the Laterodorsal Tegmental Nucleus in young compared to adult mice? Program from Department of Pharmaceutical Sciences, PhD Student Research Day, University of Copenhagen.

96. Christensen MH, Nielsen ML, Kohlmeier KA. Electrophysiological changes in laterodorsal tegmental neurons associated with prenatal nicotine exposure: implications for heightened susceptibility to addict to drugs of abuse. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 1-19, 2014.
97. Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* 2007; 28: 931-937.
98. Clark, PBS. Recent progress in identifying nicotine cholinoreceptors in mamalian brain. *Psychopharmacol*. 92:135. 1987.
99. Clarke PB. Dopaminergic mechanisms in the locomotor stimulant effects of nicotine. *Biochem Pharmacol*. 1990 Oct 1;40(7):1427-32. Review.
100. Clarren, S. K. Neuropathology in fetal alcohol syndrome. West JR (Eds.). *Alcohol and Brain Development*. Oxford University Press, New York. 1986.
101. Clemens KJ, Caille S, Stinus L, Cador M. The addition of five minor tobacco alkaloids increases nicotine-induced hyperactivity, sensitization and intravenous self-administration in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009;12:1355–66.
102. Clements JR, Grant S. Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. *Neurosci Lett*. 1990 Nov 27;120(1):70-3
103. Coggins CR. An updated review of inhalation studies with cigarette smoke in laboratory animals. *Int J Toxicol*. 2007 Jul-Aug;26(4):331-8. Review.
104. Cohen A, George O. Animal models of nicotine exposure: relevance to second-hand smoking, electronic cigarette use, and compulsive smoking. *Front Psychiatry*. 2013 Jun 4;4:41.
105. Coles CD, Brown RT, Smith IE, Platzman KA, Erickson S, Falek A. Effects of prenatal alcohol exposure at school age. I. Physical and cognitive development. *Neurotoxicol.Teratol*. 1991; 13: 357-367.
106. Cornelius MD, Leech SL, Goldschmidt L, et al. Is prenatal tobacco exposure a risk factor for early adolescent smoking? A follow-up study. *Neurotoxicol Teratol* 2005;27:667–76.
107. Cornelius MD, Geva D, Day NL, Cornelius JR, Taylor PM. Patterns and covariates of tobacco use in a recent sample of pregnant teenagers. *J Adolesc Health*. 1994 Nov;15(7):528-35.
108. Cornelius MD, Leech SL, Goldschmidt L, Day NL. Prenatal tobacco exposure: is it a risk factor for early tobacco experimentation? *Nicotine Tob Res*. 2000 Feb;2(1):45-52.
109. Corrigan WA, Coen KM, Adamson KL. Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. *Brain Res*. 1994 Aug 8;653(1-2):278-84.

110. Corrigan WA, Franklin KB, Coen KM, Clarke PB. The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1992;107(2-3):285-9.
111. Cousins MS, Roberts DC, de Wit H. GABA(B) receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings. *Drug Alcohol Depend*. 65:209–20, 2002.
112. Crooks PA, Dwoskin LP. Contribution of CNS nicotine metabolites to the neuropharmacological effects of nicotine and tobacco smoking. *Biochem Pharmacol* 54:743–53, 1997.
113. Cudd TA. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp.Biol.Med.(Maywood)* 230: 389-393, 2005.
114. Curvall, M., Elwin, C. E., Kasemi, V. E. et al. The pharmacokinetics of nicotine in plasma and saliva from non-smoking health volunteers. *Europ J Clin Pharmacol*. 38:281. 1990
115. Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:699–729. 2007.
116. Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 70: 439-46. 2001.
117. Dani JA, Radcliffe KA, Pidoplichko VI. Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *European Journal of Pharmacology*, 393:31-8. 2000.
118. Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:699-729. Review.
119. Dani JA, Heinemann S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*. 1996 May;16(5):905-8.
120. David V, Durkin TP, Cazala P. Differential effects of the dopamine D2/D3 receptor antagonist sulpiride on self-administration of morphine into the ventral tegmental area or the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)*. 160:307-317. 2002.
121. Dawson, D.A., 2000. Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend*. 59, 235–249.
122. De Biasi M, Salas R. Influence of neuronal nicotinic receptors over nicotine addiction and withdrawal. *Exp Biol Med (Maywood)*. 233:917–929, 2008.
123. De Biasi M. Nicotinic receptor mutant mice in the study of autonomic function. *Current Drugs Targets CNS Neurological Disorders*, 1:331-6, 2002.
124. Degroot A, Treit D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Brain Res*. 2002 Sep 13;949(1-2):60-70.

125. Deng C, Li K-Y, Zhou C, Ye J-H. Ethanol Enhances Glutamate Transmission by Retrograde Dopamine Signaling in a Postsynaptic Neuron/Synaptic Bouton Preparation From the Ventral Tegmental Area. 34(5): 1233–1244, 2009.
126. Di Chiara G. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *European Journal of Pharmacology*, 393:295-314. 2000.
127. Di DG, Imperato A. Drugs abuse by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:5274-5278. 1998.
128. Dierker L, Lloyd-Richardson E, Stolar M, Flay B, Tiffany S, Collins L, Bailey S, Nichter M, Clayton R; Tobacco Etiology Research Network (TERN). The proximal association between smoking and alcohol use among first year college students. *Drug Alcohol Depend*. 2006 Jan 4;81(1)
129. Dickerson D, Pittman B, Ralevski E, Perrino A, Limoncelli D, Edgecombe J e colaboradores. Ethanol-like effects of thiopental and ketamine in healthy humans. *J.Psychopharmacol*. 2010; 24: 203-211.
130. DiFranza JR, Savageau JA, Rigotti NA, Fletcher K, Ockene JK, McNeill AD, Coleman M, Wood C. Development of symptoms of tobacco dependence in youths: 30 month follow up data from the DANDY study. *Tob Control*. 11:228-235, 2000.
131. DiFranza JR, Savageau JA, Fletcher K, Ockene JK, Rigotti NA, McNeill AD, Coleman M, Wood C. Measuring the loss of autonomy over nicotine use in adolescents: the DANDY (Development and Assessment of Nicotine Dependence in Youths) study. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2002 Apr;156(4):397-403.
132. DiFranza JR, Savageau JA, Fletcher K, Ockene JK, Rigotti NA, McNeill AD, Coleman M, Wood C. Measuring the loss of autonomy over nicotine use in adolescents: the DANDY (Development and Assessment of Nicotine Dependence in Youths) study. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2002a Apr;156(4):397-403.
133. DiFranza JR, Savageau JA, Rigotti NA, Fletcher K, Ockene JK, McNeill AD, Coleman M, Wood C. Development of symptoms of tobacco dependence in youths: 30 month follow up data from the DANDY study. *Tob Control*. 2002b Sep;11(3):228-35.
134. DiFranza JR. Hooked from the first cigarette. *Sci Am*. 2008 May;298(5):82-7.
135. DiFranza JR1, Guerrera MP. Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol*. 1990 Mar;51(2):130-5.
136. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum.Dev*. 3: 79-83, 1979.
137. Doig J, McLennan JD, Gibbard WB. Medication effects on symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in children with fetal alcohol spectrum disorder. *J Child Adolesc.Psychopharmacol*. 2008; 18: 365-371.
138. Domino EF, Yamamoto KI. Nicotine: effect on the sleep cycle of the cat. *Science*, 150: 637-8, 1965.

139. Donovan JE, Jessor R, Costa FM. Adolescent health behavior and conventionality-unconventionality: an extension of problem-behavior theory. *Health Psychol.* 1991;10(1):52-61.
140. Dopico AM, Lovinger DM. Acute alcohol action and desensitization of ligand-gated ion channels. *Pharmacol Rev.* 2009; 61: 98-114.
141. Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP. Motivational systems in adolescence: possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain Cogn.* 2010 Feb;72(1):114-23. doi: 10.1016/j.bandc.2009.08.008. Epub 2009 Sep 16. Review.
142. Doura MB et al. Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res.*, 1215:40–52. 2008.
143. Drevets WC, Gautier C, Price JC, Kupfer DJ, Kinahan PE, Grace AA, Price JL, Mathis CA. Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biol Psychiatry.* 2001 Jan 15;49(2):81-96.
144. Dube, M., Greem, C. R. Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Advances in Tobacco.Science.* 2:42. 1982
145. Duffy J, Coates TJ. Reducing smoking among pregnant adolescents. *Adolescence.* 1989 Spring;24(93):29-37.
146. Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine and Brain Development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 84(1):30-44, 2008.
147. Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 22: 998-1040, 1998.
148. Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurons of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch.* 414:600-612.1989.
149. Egebjerg JK, Jensen A, Norh B, Kruger KS. Do pregnant women still smoke? A study of smoking patterns among 261,029 primiparous women in Denmark 1997-2005. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87:760-767. 2008.
150. Elgoyhen AB et al. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*, 79:705-15. 1994.
151. Elgoyhen AB et al. Alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proceedings of the National Academy Science U S A*, 98:3501-6. 2001.
152. Engin E, Treit D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol.* 2007 Sep;18(5-6):365-74. Review.

153. England LJ, Grauman A, Qian C, Wilkins DG, Schisterman EF, Yu KF, Levine RJ. Misclassification of maternal smoking status and its effects on an epidemiologic study of pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res.* 9: 1005-1013, 2007.
154. Eskenazi B, Prehn AW, Christianson RE. Passive and active maternal smoking as measured by serum cotinine: the effect on birthweight. *Am J Public Health.* 1995 Mar;85(3):395-8.
155. Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet.* 2003 Sep 13;362(9387):847-52.
156. Famy C1, Streissguth AP, Unis AS. Mental illness in adults with fetal alcohol syndrome or fetal alcohol effects. *Am J Psychiatry.* 1998 Apr;155(4):552-4.
157. Fenster CP et al. Upregulation of surface alpha4beta2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *The journal of neuroscience,* 19:4804-14. 1999.
158. Fenster CP, Rains MF, Noerager B, Quick MW, Lester RA. Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J. Neurosci* 17:5747-5759, 1997.
159. Ferguson, B. B., Wilson, D. V., Schaffer, W. Determination of nicotine concentration in human milk. *Am J Dis Child.* 130:837. 1976.
160. Fergusson DM, Woodward LJ, Horwood LJ. Maternal smoking during pregnancy and psychiatric adjustment in late adolescence. *Arch Gen Psychiatry* 1998;58:721–7.
161. Fibiger HC, LePiane FG, Jakubovic A, Phillips AG. The role of dopamine in intracranial self-stimulation of the ventral tegmental area. *J Neurosci.* 7:3888-3896. 1987.
162. Fidler JA, Wardle J, Brodersen NH, Jarvis MJ, West R. Vulnerability to smoking after trying a single cigarette can lie dormant for three years or more. *Tob Control.* 2006 Jun;15(3):205-9.
163. File SE, Cheeta S, Kenny PJ. Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *European Journal of Pharmacology,* 393: 231-6. 2000.
164. Filgueiras CC, Krahe TE, Medina AE. Amelioration of learning and memory deficits by a phosphodiesterase type 1 inhibitor in a rodent model of fetal alcohol spectrum disorder. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 33: 36-. 2009a.
165. 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.* 473: 202-207, 2010.
166. Filgueiras CC, Ribeiro-Carvalho A, Nunes F, Abreu-Villaça Y, Manhães AC. Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 93: 148-154, 2009b

167. Filgueiras CC, Ribeiro-Carvalho A, Nunes F, Abreu-Villaça Y, Manhães AC. Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 93: 148-154, 2009.
168. Filip M, Thomas ML, Cunningham KA. Dopamine D5 receptors in nucleus accumbens contribute to the detection of cocaine in rats. *J Neurosci.* 2000 Oct 1;20(19):RC98.
169. Fiorino DF, Coury A, Fibiger HC, Phillips AG. Electrical stimulation of reward sites in the ventral tegmental area increases dopamine transmission in the nucleus accumbens of the rat. *Behav Brain Res.* 1993 Jun 30;55(2):131-41.
170. Flay BR. Psychosocial approaches to smoking prevention: a review of findings. *Health Psychol.* 1985;4(5):449-88. Review.
171. Fleming P, Blair PS. Sudden infant death syndrome and parental smoking. *Early Hum Dev* 83:721– 725. 2007.
172. Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci.* 2003 Sep;6(9):968-73.
173. Forster GL, Blaha CD. Pedunculo pontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur J Neurosci.* 2003 Feb;17(4):751-62.
174. Fowler CD, Arends MA, Kenny PJ. Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: evidence from genetically modified mice. *Behav Pharmacol* 19:461-484, 2008.
175. Fowler, J.S., Logan, J., Wang, G.-J., Volkow, N.D. Monoamine oxidase and cigarette smoking. *NeuroToxicology* 24 (1), 75e82, 2003.
176. Friend KB, Pagano ME. Smoking cessation and alcohol consumption in individuals in treatment for alcohol use disorders. *J Addict Dis.* 24:61–75, 2005.
177. Fryer SL, McGee CL, Matt GE, Riley EP, Mattson SN. Evaluation of psychopathological conditions in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Pediatrics* 2007; 119: e733-e741.
178. Fu Y, Matta SG, Brower VG, Sharp BM Norepinephrine secretion in the hypothalamic para-ventricular nucleus of rats during unlimited access to self-administered nicotine: An in vivo microdialysis study. *J Neurosci* 2001 21:8979–8989
179. Gao YJ, Holloway AC, Zeng ZH, Lim GE, Petrik JJ, Foster WG & Lee RM 2005 Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obesity Research* 13 687–692.
180. Geiger JR, Bischofberger J, Vida I, Frobe U, Pfitzinger S, Weber HJ, Haverkamp K, Jonas P. Patch-clamp recording in brain slices with improved slicer technology. *Pflugers Arch.* 443:491-501. 2002.

181. Giancola PR, Martin CS, Tarter RE, Pelham WE, Moss HB. Executive cognitive functioning and aggressive behavior in preadolescent boys at high risk for substance abuse/dependence. *J Stud Alcohol*. 1996 Jul;57(4):352-9
182. Gilbertson RJ, Barron S. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacol.Biochem.Behav*. 81: 54-64, 2005.
183. Gilliland FD, Li YF, Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Feb;163(2):429-36.
184. Ginzel KH, Maritz GS, Marks DF, Neuberger M, Pauly JR, Polito JR, Schulte-Hermann R, Slotkin TA. Critical review: nicotine for the fetus, the infant and the adolescent? *J Health Psychol*. 2007 Mar;12(2):215-24. Review.
185. Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. *Neurosci Lett*. 1990 Nov 27;120(1):70-3.
186. Goldschmidt L, Cornelius MD, Day NL. Prenatal cigarette smoke exposure and early initiation of multiple substance use. *Nicotine Tob Res*. 2012 Jun;14(6):694-702.
187. Golstein, H. Cigarette smoking and low birthweight babies. *Am J Obstet Gynecol*. 114:570. 1972.
188. Gonon FG. Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience*. 1988 Jan;24(1):19-28.
189. Gonzales RA, Job MO, Doyon WM. The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacol Ther*. 103(2):121-46, 2004.
190. Good CH, Bay KD, Buchanan RA, McKeon KA, Skinner RD, Garcia-Rill E. Prenatal exposure to cigarette smoke affects the physiology of pedunculopontine nucleus (PPN) neurons in development. *Neurotoxicol Teratol*. 2006; 28, 210–219.
191. Goodlett CR, Horn KH, Zhou FC. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2005; 230: 394-406.
192. Gopalakrishnan M, Molinari EJ, Sullivan JP. Regulation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Molecular Pharmacology*, 52:524-34. 1997.
193. Grabus SD, Martin BR, Batman AM, Tyndale RF, Sellers E, Damaj MI. Nicotine physical dependence and tolerance in the mouse following chronic oral administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Mar;178(2-3):183-92
194. Grace AA, Onn SP. Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci*. 1989 Oct;9(10):3463-81.

195. Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC. Characterization of nicotinic receptor-mediated [3H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J Neurochem.* 1992 Sep;59(3):848-56.
196. Grant BF (1998) Age at smoking onset and its association with alcohol consumption and DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the national longitudinal alcohol epidemiologic survey. *J Sub-stance Abus* 10:59–73.
197. Grant KA (1994) Emerging neurochemical concepts in the actions of ethanol at ligand-gated ion channels. *Behav Pharmacol* 5: 383–404.
198. Green, C. R., Rodgman, A. The tobacco chemist research conference a halfcentury forum for advances in analytical methodology of tobacco and products. *Recent Advances Tobacco Science.* 22:131. 1996.
199. Greene NDE, Copp AJ. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenatal diagnosis Prenat Diagn*; 29: 303–311. 2009.
200. Griesler P, Kandel D, Davies M. Maternal smoking in pregnancy, child behavior problems and adolescent smoking. *J Res Adolesc* 1998;8:159–85
201. Guan, Y., Xiao, C., Krnjevic, K., Xie, G., Zuo, W., & Ye, J. H. (2012). GABAergic actions mediate opposite ethanol effects on dopaminergic neurons in the anterior and posterior ventral tegmental area. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341, 33e42.
202. Guerri C, Bazinet A, Riley EP. Fetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behavior. *Alcohol.* 44(2):108-14. 2009.
203. Guillem K, Vouillac C, Azar M, Parsons L, Koob G, Cador M, et al. Monoamine oxidase inhibition dramatically increases the motivation to self-administer nicotine in rats. *J. Neurosci.* 25 (38), 8593e8600, 2005.
204. Gulliver SB, Kamholz BW, Helstrom AW. Smoking cessation and alcohol abstinence: what do the data tell us? *Alcohol Res Health.* 29:208–212, 2006.
205. Hall BJ, Wells C, Allenby C, Lin MY, Hao I, Marshall L, Rose JE, Levin ED. Differential effects of non-nicotine tobacco constituent compounds on nicotine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 120:103-8, 2014.
206. Hallanger AE, Wainer BH. Ascending projections from the pedunculopontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *J Comp Neurol.* 1988 Aug 22;274(4):483-515.
207. Hallanger AE, Levey AI, Lee HJ, Rye DB, Wainer BH. The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J Comp Neurol.* 1987 Aug 1;262(1):105-24.
208. Han JY, Joo Y, Kim YS, Lee YK, Kim HJ, Cho GJ e colaboradores. Ethanol induces cell death by activating caspase-3 in the rat cerebral cortex. *Mol.Cells* 2005; 20: 189-195.

209. Hannigan JH, Armant DR. Alcohol in pregnancy and neonatal outcome. *Semin.Neonatol.* 5: 243-254, 2000.
210. Hannigan JH, Berman RF. Amelioration of fetal alcohol-related neurodevelopmental disorders in rats: exploring pharmacological and environmental treatments. *Neurotoxicol.Teratol.* 22: 103-111, 2000.
211. Hannigan JH, Berman RF. Amelioration of fetal alcohol-related neurodevelopmental disorders in rats: exploring pharmacological and environmental treatments. *Neurotoxicol.Teratol.* 2000; 22: 103-111.
212. Hannigan JH, O'Leary-Moore SK, Berman RF. Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2007; 31: 202-211.
213. Hannigan JH. What research with animals is telling us about alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 55: 489-499, 1996.
214. Harris RA, Trudell JR, Mihic SJ. Ethanol's molecular targets. *Sci.Signal.* 2008; 1: re7-
215. Harris SR, MacKay LL, Osborn JA. Autistic behaviors in offspring of mothers abusing alcohol and other drugs: a series of case reports. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 19: 660-665, 1995.
216. Hashimoto, E., Sakaguchi, S., Shiga, M., Ikeda, N., Toki, S., Saito, T., 2001. Epidemiological studies of tobacco smoking and dependence in Japan. *Alcohol* 24, 107–110.
217. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 2006 Dec;16(6):710-5. Epub 2006 Sep 29. Review.
218. Hatcher, R. A., Grusby, H. The elimination of nicotine in the milk. *J Pharmacol Exp Therap.* 32:1. 1927.
219. Henry B, Feehan M, McGee R, Stanton W, Moffit T, Silva P. 1993. The importance of conduct problems and depressive symptoms in predicting adolescent substance use. *Journal of Abnormal Child Psychology* 21:469–480.
220. Herraiz T, Chaparro C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 326 (2), 378e386, 2005.
221. Hirayama, T. Cancer mortality in a non-smoking women with smoking husband based on a large scale cohort study in Japan. *Prev Med.* 13:680. 1984.
222. Hoffman AC, Evans SE. Abuse potential of non-nicotine tobacco smoke components: acetaldehyde, nornicotine, cotinine, and anabasine. *Nicotine Tob Res* 15:622-632. doi: 10.1093/ntr/nts192, 2013.
223. Houzec, J., Benowitz, N. L. *Psicofarmacologia básica e clínica da nicotina.* Clinic in Chest Medicine 1991. Tradução do vol 12 nº 4. Interfuro Ed Rio de Janeiro. 1999.

224. Huang HY, Hsieh SH. Analyses of tobacco alkaloids by cation-selective exhaustive injection sweeping microemulsion electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 1164:313–9, 2007.
225. Huang LZ, Abbott LC, Winzer-Serhan UH. Effects of chronic neonatal nicotine exposure on nicotinic acetylcholine receptor binding, cell death and morphology in hippocampus and cerebellum. *Neuroscience*. 2007; 146, 1854–1868.
226. Hughes J. 1986. Genetics of smoking: a brief review. *Behavioral Therapy* 17:335–345.
227. Huttenlocher PR. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia*. 28: 517-527, 1990.
228. Ieraci A, Herrera DG. Nicotinamide protects against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain. *PLoS.Med.* 2006; 3: e101-
229. Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K e colaboradores. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 2000; 287: 1056-1060.
230. Ikonomidou C. Triggers of apoptosis in the immature brain. *Brain Dev.* 2009; 31: 488-492.
231. Ishibashi M, Leonard CS, Kohlmeier KA. Nicotinic activation of laterodorsal tegmental neurons: implications for addiction to nicotine. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34, 2529–2547.
232. Istvan J, Matarazzo JD. Tobacco, alcohol, and caffeine use: a review of their interrelationships. *Psychol Bull.* 1984 Mar;95(2):301-26.
233. Ivanov A, Zilberter Y. Critical state of energy metabolism in brain slices: the principal role of oxygen delivery and energy substrates in shaping neuronal activity. *Front Neuroenergetics*. 3:9. 2011.
234. Ivorra C, García-Vicent C, Ponce F, Ortega-Evangelio G, Fernández-Formoso JA, Lurbe E. High cotinine levels are persistent during the first days of life in newborn second hand smokers. *Drug Alcohol Depend.* 2014 Jan 1;134:275-9
235. Jaddoe VW, Troe EJ, Hofman A, Mackenbach JP, Moll HA, Steegers EA, Witteman JC. Active and passive maternal smoking during pregnancy and the risks of low birthweight and preterm birth: the Generation R Study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2008 Mar;22(2):162-71.
236. Jang MH et al. Nicotine administration decreases nitric oxide synthase expression in the hypothalamus of food-deprived rats. *Neuroscience Letters*, 322: 29-32. 2002.
237. Jha, P. Avoidable global cancer deaths and total deaths from smoking. *Nat. Rev. Cancer* 9. 2009. 655–664.
238. Jia HG, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. Colocalization of gamma-aminobutyric acid and acetylcholine in neurons in the laterodorsal and

- pedunculopontine tegmental nuclei in the cat: a light and electron microscopic study. *Brain Res.* 2003 Dec 5;992(2):205-19.
239. Jia, F., Chandra, D., Homanics, G. E., & Harrison, N. L. Ethanol modulates synaptic and extrasynaptic GABAA receptors in the thalamus. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326. 2008. 475e482.
 240. Jones KL, Smith DW, Ulleland CN, Streissguth P. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* 1973; 1: 1267-1271.
 241. Jones KL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 1973; 302: 999-1001.
 242. Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry.* 2005 Aug;162(8):1403-13. Review.
 243. Kandel D, Wu P, Davies M. 1994. Maternal smoking during pregnancy and smoking by adolescent daughters. *American Journal of Public Health* 84:1407–1413.
 244. Kane VB, Fu Y, Matta SG, Sharp BM. Gestacional nicotine exposure attenuates nicotine-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens shell of adolescent Lewis rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 308:521-528. 2004.
 245. Kapoor N, Pant AB, Dhawan A, Dwivedi UN, Gupta YK, Seth PK e colaboradores. Differences in sensitivity of cultured rat brain neuronal and glial cytochrome P450 2E1 to ethanol. *Life Sci.* 2006; 79: 1514-1522.
 246. Kelly SJ, Pierce DR, West JR. Microencephaly and hyperactivity in adult rats can be induced by neonatal exposure to high blood alcohol concentrations. *Exp.Neurol.* 96: 580-593, 1987.
 247. Kendler KS, Myers J, Damaj MI, Chen X. Early smoking onset and risk for subsequent nicotine dependence: a monozygotic co-twin control study. *Am J Psychiatry.* 2013 Apr 1;170(4):408-13.
 248. Kenny PJ1, Markou A. Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001 Dec;70(4):531-49.
 249. Killen JD, Fortmann SP. Craving is associated with smoking realpse: findings from three prospective studies. *Exp Clin Psychopharmacol* 5:137-142.1997.
 250. Klein LC, Stine MM, Pfaff DW, Vandenberg DJ. Maternal nicotine exposure increases nicotine preference in periadolescent male but not female C57B1/6J mice. *Nicotine Tob Res.* 5:117-124. 2003.
 251. Kline, J., Stein, Z. A., Susser, M. et al. Smoking: A risk factor for spontaneous abortion. *N Eng J Med.* 128:1207. 1977.
 252. Klintsova AY, Goodlett CR, Greenough WT. Therapeutic motor training ameliorates cerebellar effects of postnatal binge alcohol. *Neurotoxicol.Teratol.* 2000; 22: 125-132.

253. Kodituwakku PW, Handmaker NS, Cutler SK, Weathersby EK, Handmaker SD. Specific impairments in self-regulation in children exposed to alcohol prenatally. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1995; 19: 1558-1564.
254. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology.* 35:217-238; 2010.
255. Kosten TA, Ambrosio E (2002) HPA axis function and drug addictive behaviors: insight from studies with Lewis and Fischer 344 inbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 27:35–69
256. Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature.* 2012 Nov 8;491(7423):212-7.
257. Landrigan PJ, Schechter CB, Lipton JM, Fahs MC, Schwartz J. Environmental pollutants and costs for lead poisoning, asthma, cancer and developmental disabilities. *Environ. Health Perspect.* 110: 721-728, 2002.
258. Larsson A, Engel JA. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neurosci Biobehav Rev.* 27: 713-720, 2004.
259. Lee JH, Tajuddin NF, Druse MJ. Effects of ethanol and ipsapirone on the expression of genes encoding anti-apoptotic proteins and an antioxidant enzyme in ethanol-treated neurons. *Brain Res.* 2009; 1249: 54-60.
260. Lehtovirta, P., Forss, M. The acute effect of smoking on intervillous blood flow of the placenta. *Brit J Obstet Gynecol.* 85:729. 1978.
261. Lepore M, Franklin KB. N-methyl-D-aspartate lesions of the pedunculopontine nucleus block acquisition and impair maintenance of responding reinforced with brain stimulation. *Neuroscience.* 1996 Mar;71(1):147-55.
262. Lerner JV, Vicary JR Difficult temperament and drug use: analyses from the New York Longitudinal Study. *J Drug Educ.* 1984;14(1):1-8..
263. Levin ED, Lawrence SS, Petro A, Horton K, Rezvani AH, Seidler FJ. Adolescent vs. adult-onset nicotine self-administration in male rats: duration of effect and differential nicotinic receptor correlates. *Neurotoxicol Teratol.* 29:458–65, 2007.
264. Levin ED, Lawrence SS, Petro A, Horton K, Seidler FJ, Slotkin TA. Increased nicotine self-administration following prenatal exposure in female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 85:669-674. 2006.
265. Levin ED, Simon BB. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology,* 138: 217-30. 1998.
266. Lewis, A., Miller, J., Lea, R. Monoamine oxidase and tobacco dependence. *Neurotoxicology* 28 (1), 182e195. 2007.
267. Li MD, Burmeister M. New insights into the genetics of addiction. *Nat Rev Genet.* 2009 Apr;10(4):225-31. doi: 10.1038/nrg2536.

268. Lieb R, Schreier A, Pfister H, et al. Maternal smoking and smoking in adolescents: a prospective community study of adolescents and their mothers. *Eur Addict Res* 2003;9:120–30.
269. Lindstrom J et al Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Progress in Brain Research*, 109: 125-37. 1996.
270. Lodge DJ, Grace AA. The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 28;103(13):5167-72
271. Lovinger DM, Crabbe JC. Laboratory models of alcoholism: treatment target identification and insight into mechanisms. *Nat. Neurosci.* 2005; 8: 1471-1480.
272. Luck, W., Hansen, R., Steldinger, R. et al. Nicotine and Cotinine – Two pharmacologically actives substances as parameters for the strain on fetuses and babies of mothers who smoke. *J Perinatal Med.* 10:107. 1982.
273. Luck W, Nau H, Hansen R, Steldinger R. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers. *Dev Pharmacol Ther.* 1985;8(6):384-95.
274. Lukas RJ, Muresan AZ, Damaj MI, Blough BE, Huang X, Navarro HA, et al. Synthesis and characterization of in vitro and in vivo pro files of hydroxybupropion analogues: aids to smoking cessation. *J Med Chem* 2010;53:4731–48.
275. MacCarver, D.G., Thomasson HR, Martier SS, Sokol RJ, Li T. Alcohol dehydrogenase- 2*3 allele protects against alcohol-related birth defects among African-Americans. *Teratology* 1997; 283: 1095-1101.
276. Maciuk A, Moaddel R, Haginaka J, Wainer IW. Screening of tobacco smoke condensate for nicotinic acetylcholine receptor ligands using cellular membrane affinity chromatography columns and missing peak chromatography. *J Pharm Biomed* 48:238–46, 2008.
277. Maier SE, Miller JA, Blackwell JM, West JR. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: regional differences in cell loss as a function of the timing of binge-like alcohol exposure during brain development. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1999; 23: 726-734.
278. 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 Nov 21;193(2):216-24.
279. Mansvelder HD, McGehee DS. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron.* 2000 Aug;27(2):349-57.
280. Mansvelder HD1, Keath JR, McGehee DS. Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron.* 2002 Mar 14;33(6):905-19.
281. Manzardo AM, Stein L, Belluzzi JD. Rats prefer cocaine over nicotine in a two-lever self-administration choice test. *Brain Res* 2002;924:10–9.

282. Marks JL, Hill EM, Pomerleau CS, Mudd SA, Blow FC. Nicotine dependence and withdrawal in alcoholic and nonalcoholic ever-smokers. *J Subst Abuse Treat.* 1997 Nov-Dec;14(6):521-7.
283. Marubio LM, del Mar Arroyo-Jimenez M, Cordero-Erausquin M, et al. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* 398:805–810. 1999.
284. Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N, Cloëz-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature.* 2005 Jul 7;436(7047):103-7.
285. Maskos U. The cholinergic mesopontine tegmentum is a relatively neglected nicotinic master modulator of the dopaminergic system: relevance to drugs of abuse and pathology. *Br J Pharmacol.* 2008 Mar;153 Suppl 1:S438-45. doi: 10.1038/bjp.2008.5. Epub 2008 Jan 28. Review.
286. Matta SG, Elberger AJ. Combined exposure to nicotine and ethanol throughout full gestation results in enhanced acquisition of nicotine self-administration in young adult rat offspring. *Psychopharmacology (Berl).* 193(2):199-213, 2007.
287. Mattson SN, Schoenfeld AM, Riley EP. Teratogenic effects of alcohol on brain and behavior. *Alcohol Res.Health* 2001; 25: 185-191.
288. May PA, Fiorentino D, Coriale G, Kalberg WO, Hoyme HE, Aragon AS e colaboradores. Prevalence of children with severe fetal alcohol spectrum disorders in communities near rome, Italy: new estimated rates are higher than previous estimates. *Int.J.Environ.Res.Public Health.* 8: 2331-2351, 2011;
289. May PA, Gossage JP, Kalberg WO, Robinson LK, Buckley D, Manning M, Hoyme HE. Prevalence and epidemiologic characteristics of FASD from various research methods with an emphasis on recent in-school studies. *Dev Disabil Res Rev.* 15(3):176-92, 2009.
290. May PA, Gossage JP. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Res.Health.* 25: 159-167, 2001.
291. Mcgehee DS, Role LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annual Review Physiology,* 57:521-46. 1995.
292. McMurray MS, Williams SK, Jarrett TM, Cox ET, Fay EE, Overstreet DH, Walker CH, Johns JM. Gestational ethanol and nicotine exposure: effects on maternal behavior, oxytocin, and offspring ethanol intake in the rat. *Neurotoxicol Teratol.* 30(6):475-86, 2008.
293. McWilliams JR, Lynch G. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science.* 221: 572-57, 1983.

294. McWilliams JR, Lynch G. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science*. 221: 572-574, 1983.
295. Medina AE. Fetal Alcohol Spectrum Disorders and Abnormal Neuronal Plasticity. *Neuroscientist*. 2011a; 17: 274-287.
296. Melcer T, Gonzalez D, Barron S, Riley EP. Hyperactivity in preweanling rats following postnatal alcohol exposure. *Alcohol*. 11: 41-45, 1994.
297. Melcer T, Gonzalez D, Barron S, Riley EP. Hyperactivity in preweanling rats following postnatal alcohol exposure. *Alcohol*. 11: 41-45, 1994.
298. Meyer, M. B., Tonascia, J. A., Buck, C. The interrelation of maternal smoking and increased perinatal mortality with other risk factors further analysis of the Ontario Perinatal Mortality Study. *Am J Epidemiol*. 100:443. 1974
299. Meyerhoff DJ, Tizabi Y, Staley JK, Durazzo TC, Glass JM, Nixon SJ. Smoking comorbidity in alcoholism: neurobiological and neurocognitive consequences. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006 Feb;30(2):253-64.
300. Mezzich AC, Tarter RE, Kirisci L, Hsieh YC, Grimm M. Coping capacity in female adolescent substance abusers. *Addict Behav*. 1995 Mar-Apr;20(2):181-7.
301. Miao H, Liu C, Bishop K, Gong ZH, Nordberg A, Zhang X. Nicotine exposure during a critical period of development leads to persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 70:752—762, 1998.
302. Middaugh LD, Boggan WO. Postnatal growth deficits in prenatal ethanol-exposed mice: characteristics and critical periods. *Alcohol Clin.Exp.Res*. 15: 919-926, 1991.
303. Mieda M, Hasegawa E, Kisanuki YY, Sinton CM, Yanagisawa M, Sakurai T. Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *J Neurosci*. 31:65518-6526. 2011.
304. Miller NS, Gold MS. Comorbid cigarette and alcohol addiction: epidemiology and treatment. *J Addict Dis*. 1998;17(1):55-66. Review.
305. Ministério da saúde. Vigitel Brasil 2009. Saúde suplementar vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11461 .
306. Mirenowicz J1, Schultz W. Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature*. 1996 Feb 1;379(6564):449-51.
307. Mitchell EA, Ford RP, Stewart AW, Taylor BJ, Becroft DM, Thompson JM, Scragg R, Hassall IB, Barry DM, Allen EM, et al. Smoking and the sudden infant death syndrome. *Pediatrics*. 1993 May;91(5):893-6.
308. MMWR. Smoking during pregnancy-United States, 1990-2002. *Morbidity Mortal Weekly Report*. 53: 911-915, 2004.

309. Moon RY, Horne RS, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370:1578–1587. 2007.
310. Moss HB, Kirisci L, Gordon HW, Tarter RE. A neuropsychologic profile of adolescent alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994 Feb;18(1):159-63.
311. Mukherjee RA, Hollins S, Turk J. Fetal alcohol spectrum disorder: an overview. *J R.Soc.Med.* 2006; 99: 298-302.
312. Mullen PD. How can more smoking suspension during pregnancy become lifelong abstinence? Lessons learned about predictors, interventions, and gaps in our accumulated knowledge. *Nicotine Tob Res*. 2004 Apr;6 Suppl 2:S217-38.
313. Naeff B, Schlumpf M, Lichtensteiger W. Pre- and postnatal development of high-affinity [3H]nicotine binding sites in rat brain regions: an autoradiographic study. *Brain Res Dev Brain Res*. 1992 Aug 21;68(2):163-74.
314. Naeye, R. L., Harkness, W. L., UTTS, J. Abruptio placental and perinatal death. *Am J Obstet Gynecol*. 128:1207. 1977.
315. National Institute of Drug Abuse (NIDA).
<http://www.drugabuse.gov/publications/drugs-brains-behavior-science-addiction/drug-abuse-addiction>; 2013
316. Navarro HA, Seidler FJ, Schwartz RD, et al. Prenatal exposure to nicotine impairs nervous system development at a dose which does not affect viability or growth. *Brain Res Bull* 23:187–192. 1989.
317. ND, Wang GJ, Fowler JS, Thanos PP, Logan J, Gatley SJ, Gifford A, Ding YS, Wong C, Pappas N. Brain DA D2 receptors predict reinforcing effects of stimulants in humans: replication study. *Synapse*. 2002 Nov;46(2):79-82. Erratum in: *Synapse*. 2003 Mar 15;47(4):295.. Thanos Pether [corrected to Thanos Panayotis Peter K].
318. 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 Jan;85(1):34-40.
319. Nelson LR, Lewis JW, Kokka N, Branch BJ, Taylor AN. Prenatal exposure to ethanol potentiates morphine-induced hypothermia in adult rats. *Neurobehav Toxicol Teratol*. 1986 Sep-Oct;8(5):469-74.
320. Nesil T, Kanit L, Collins AC, Pogun S. Individual differences in oral nicotine intake in rats. *Neuropharmacology*. 2011 Jul-Aug;61(1-2):189-201.
321. Niaura R, Bock B, Lloyd EE, Brown R, Lipsitt LP, Buka S. . Maternal transmission of nicotine dependence: psychiatric, neurocognitive and prenatal factors. *Am J Addict*. 2001 Winter;10(1):16-29. Review
322. Nisell M, Nomikos GG, Svensson TH. Infusion of nicotine in the ventral tegmental area or the nucleus accumbens of the rat differentially affects accumbal dopamine release. *Pharmacol Toxicol*. 1994 Dec;75(6):348-52.

323. Nisell M, Nomikos GG, Svensson TH. Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Synapse*. 1994 Jan;16(1):36-44.
324. Nordberg A, Zhang XA, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal nicotine exposure induces permanent changes in brain nicotinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991 Nov 19;63(1-2):201-7.
325. Nowoslawski L, Klocke BJ, Roth KA. Molecular regulation of acute ethanol-induced neuron apoptosis. *J Neuropathol.Exp.Neurol*. 2005; 64: 490-497.
326. Nunes F, Ferreira-Rosa K, Pereira Mdos D, Kubrusly RC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC. Acute administration of vinpocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of fetal alcohol spectrum disorder. *Drug Alcohol Depend*. 119: 81-87, 2011.
327. Nunes-Freitas AL, Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Dutra-Tavares AC, Manhães AC, Lisboa PC, Oliveira E, Gaspar de Moura E, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y. Nicotine exposure during the third trimester equivalent of human gestation: time course of effects on the central cholinergic system of rats. *Toxicol Sci*. 2011 Sep;123(1):144-54. doi: 10.1093/toxsci/kfr147. Epub 2011 Jun 1.
328. Nunez JL, McCarthy MM. Cell death in the rat hippocampus in a model of prenatal brain injury: time course and expression of death-related proteins. *Neuroscience* 2004; 129: 393-402.
329. O'Loughlin J, DiFranza J, Tyndale RF, Meshefedjian G, McMillan-Davey E, Clarke PB, et al. Nicotine-dependence symptoms are associated with smoking frequency in adolescents. *Am J Prev Med*. 25:219–25, 2003.
330. Oakman SA, Faris PL, Kerr PE, Cozzari C, Hartman BK. Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci*. 1995 Sep;15(9):5859-69.
331. Oakman SA, Faris PL, Kerr PE, Cozzari C, Hartman BK. Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci*. 1995 Sep;15(9):5859-69.
332. OLDS J, MILNER P. Positive reinforcement procuced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*. 47:419-427. 1954.
333. 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*. 28; 167(1):163-73, 2010.
334. Oliveira, Elaine de, Moura, Egberto G, Santos-Silva, Ana Paula, Pinheiro, Cíntia R, Lima Natalia S, Nogueira-Neto José Firmino, Nunes-Freitas Andre L, Abreu-Villaca Yael, Passos Magna C F, Lisboa Patri'cia C. Neonatal nicotine exposure causes insulin and leptin resistance and inhibits hypothalamic leptin signaling in adult rat offspring. *Journal of Endocrinology* (2010) 206, 55–63

335. 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 Neuroscience*. 27(6):539-48, 2009.
336. Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Farber NB, Bittigau P, Ikonomidou C. Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol*. 2002; 12: 488-498.
337. Olney JW. Fetal alcohol syndrome at the cellular level. *Addict.Biol*. 2004; 9: 137-149.
338. Omelchenko N1, Sesack SR. Cholinergic axons in the rat ventral tegmental area synapse preferentially onto mesoaccumbens dopamine neurons. *J Comp Neurol*. 2006 Feb 20;494(6):863-75.
339. Omelchenko N1, Sesack SR. Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol*. 2005 Mar 7;483(2):217-35.
340. Oncken C, McKee S, Krishnan-Sarin S, O'Malley S, Mazure C (2004) Gender effects of reported in utero tobacco exposure on smoking initiation, progression and nicotine dependence in adult offspring. *Nicotine Tob Res* 6:829–833
341. Organización Panamericana de Saúde (OPAS). Banco mundial – La epidemia del tabaquismo. Publicación científica N° 577. 2000.
342. Orr-Urtreger A, Goldner FM, Saeki M, et al. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci* 17: 9165–9171. 1997.
343. Pakkanen JS, Jokitalo E, Tuominen RK. Up-regulation of beta2 and alpha7 subunit containing nicotinic acetylcholine receptors in mouse striatum at cellular level. *Eur J Neurosci*. 2005 May;21(10):2681-91.
344. Pastrakuljic A, Schwartz R, Simone C, Derewlany LO, Knie B, Koren G. Transplacental transfer and biotransformation studies of nicotine in the human placental cotyledon perfused in vitro. *Life Sci*. 1998; 63, 2333–2342.
345. Patten CA, Martin JE, Owen N. Can psychiatric and chemical dependency treatment units be smoke free? *J Subst Abuse Treat*. 1996 Mar-Apr;13(2):107-18. Review.
346. Pauly JR, Slotkin TA. Maternal tobacco smoking, nicotine replacement and neurobehavioural development. *Acta Paediatr*. 97(10):1331-7, 2008.
347. Pauly JR, Sparks JA, Hauser KF, Pauly TH. In utero nicotine exposure causes persistent, gender-dependant changes in locomotor activity and sensitivity to nicotine in C57Bl/6 mice. *Int J Dev Neurosci*. 2004; 22, 329–337.
348. Pentel PR, Keyler DE, Chen Y, et al. Vaccination against nicotine does not prevent nicotine-induced changes in fetal nicotinic receptor binding and c-fos mRNA expression in rats. *Neurotoxicol Teratol* 28:589–596. 2006.

349. Perraudin, M. L., Sorin, M. Intoxication d'un nouveau-né par la nicotine present dans le lait de sa mère. *Ann Pediat.* 25:41. 1978.
350. Perry DC et al. Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289: 1545–1552. 1999.
351. Piasecki TM, Jorenby DE, Smith SS, Fiore MC, Baker TB. Smoking withdrawal dynamics. I. Abstinence distress in lapsers and abstainers. *J Abnorm Psychol.* 112:3–13, 2003.
352. Picciotto MR, Zoli M, Lena C, et al. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* 374:65–67. 1995.
353. Pidoplichko VI, DeBiase M, Williams JT, Dani JÁ. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390:401-404, 1997.
354. Pierce JP, Gilpin E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *Am J Public Health.* 1996 Feb;86(2):253-6.
355. Pilarski JQ, Wakefield HE, Fuglevand AJ, Levine RB, Fregosi RF. Developmental nicotine exposure alters neurotransmission and excitability in hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 107:257-264. 2012
356. Poindexter Jr., E., Carpenter R. The isolation of harmaine and norharmaine from tobacco and cigarette smoke. *Phytochemistry* 1, 215e221, 1962.
357. Pomerleau OF, Collins AC, Shiffman S, Pomerleau CS. Why some people smoke and others do not: new perspectives. *J Consult Clin Psychol.* 1993 Oct;61(5):723-31. Review.
358. Pomerleau OF. Individual differences in sensitivity to nicotine: implications for genetic research on nicotine dependence. *Behav Genet.* 1995 Mar;25(2):161-77. Review.
359. Pons S, Fattore L, Cossu G, Tolu S, Porcu E, McIntosh JM, Changeux JP, Maskos U, Fratta W. Crucial role of alpha4 and alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration. *J Neurosci.* 2008 Nov 19;28(47):12318-27.
360. Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19;92(26):12304-8.
361. Pontieri FE1, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature.* 1996 Jul 18;382(6588):255-7.
362. 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: 145-159.

363. Quick MW, Lester RA. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol.* 53:457-478, 2002.
364. Quinley, M. E., Sheeman, K. L., Wilkes, M. M. et al. Effects of maternal smoking on circulation catecholamines levels and fetal heart rates. *Am J Obstet Gynecol.* 133:685. 1979.
365. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition.* 21:775-777, 2005.
366. Racicot S, McGrath JJ, Karp I, O'loughlin J. Predictors of nicotine dependence symptoms among never-smoking adolescents: a longitudinal analysis from the Nicotine Dependence in Teens Study. *Drug Alcohol Depend.* 130:388-44. 2013.
367. Racicot S, McGrath JJ, O'loughlin J. An investigation of social and pharmacological exposure to secondhand tobacco smoke as possible predictors of perceived nicotine dependence, smoking susceptibility, and smoking expectancies among never-smoking youth. *Nicotine Tob Res.* 13:926-933. 2011.
368. Rantakallio, P. Groups at risk in low birth weight infants and perinatal mortality. *Acta Pediat Scand.* 163. 1969.
369. Rapier C1, Lunt GG, Wonnacott S. Stereoselective nicotine-induced release of dopamine from striatal synaptosomes: concentration dependence and repetitive stimulation. *J Neurochem.* 1988 Apr;50(4):1123-30.
370. Rasmussen C. Executive functioning and working memory in fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 29: 1359-1367, 2005.
371. Rees S, Inder T. Fetal and neonatal origins of altered brain development. *Early Hum Dev.* 2005 Sep;81(9):753-61. Review.
372. Ribeiro VS, Figueiredo FP, Silva AA, Batista RL, Barbieri MA, Lamy Filho F, Alves MT, Santos AM, Bettiol H. Do socioeconomic factors explain why maternal smoking during pregnancy is more frequent in a more developed city of Brazil? *Braz J Med Biol Res.* 40: 1203-1210, 2007.
373. Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, de Medeiros AH, Siqueira NR, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: Effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience.* 162(4):1174-86, 2009.
374. 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.* 1232: 48-60, 2008.
375. Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Nunes-Freitas AL, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on depressive-like behavior during exposure and withdrawal. *Behav Brain Res.* 221(1):282-9, 2011.

376. Ricceri L, Hohmann C, Berger-Sweeney J. Early neonatal 192 IgG saporin induces learning impairments and disrupts cortical morphogenesis in rats. *Brain Res.* 954, 160–172, 2002.
377. Riley EP, Barron S, Melcer T, Gonzalez D. Alterations in activity following alcohol administration during the third trimester equivalent in P and NP rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 17: 1240-1246, 1993.
378. Riley EP, Infante MA, Warren KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol.Rev.* 2011; 21: 73-80.
379. Riley EP, McGee CL. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2005; 230: 357-365.
380. Roberto M, Schweitzer P., Madamba SG, Stouffer DG., Parsons LH, Siggins GR. Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: an in vitro and in vivo analysis. *Journal of Neuroscience*, 24, 1594e1603, 2004.
381. Roberts KH, Munafo MR, Rodriguez D, Drury M, Murphy MF, Neale RE, Nettle D. Longitudinal analysis of the effect of prenatal nicotine exposure on subsequent smoking behavior of offspring. *Nicotine Tob Res* 7:801–808, 2005.
382. Robinson SF, Marks MJ, Collins AC. Inbred mouse strains vary in oral self-selection of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*. 124(4):332-9, 1996.
383. Roebuck TM, Mattson SN, Riley EP. A review of the neuroanatomical findings in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 22: 339-344, 1998.
384. Rollema H, Chambers LK, Coe JW, Glowa J, Hurst RS, Lebel LA, Lu Y, Mansbach RS, Mather RJ, Rovetti CC, Sands SB, Schaeffer E, Schulz DW, Tingley FD 3rd, Williams KE. Pharmacological profile of the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline, an effective smoking cessation aid. *Neuropharmacology*. Mar;52(3):985-94, 2007.
385. Rose JE, Corrigall WA. Nicotine self-administration in animals and humans: similarities and differences. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;130:28–40.
386. Rose JE. Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006 Mar;184(3-4):274-85. Epub 2005 Dec 16. Review.
387. Rosemberg, J. Câncer do Pulmão. In *Pandemia do Tabagismo*. Ed Secretaria de Saúde do Estado de S. Paulo. 2002.
388. Ross SA et al. Phenotypic characterization of an alpha 4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. *The journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience*, 20: 6431-41. 2000.
389. Russo P, Nastrucci C, Alzetta G, Szalai C. Tobacco habit: historical, cultural, neurobiological, and genetic features of people's relationship with an addictive drug. *Perspect Biol Med*. 2011 Autumn;54(4):557-77.

390. Salamone F, Zhou M. Aberrations in nicotinic acetylcholine receptors structure, function, and expressions: implications in disease. *MJM* 5, 90-97. 2000.
391. Salin-pascual RJ et al. Changes in sleep after acute and repeated administration of nicotine in the rat. *Psychopharmacology*, 145:133-8. 1999.
392. SAMHSA. Results from the 2007 National Survey on Drug Use and Health: National findings. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Office of Applied Studies. 2008
393. Santos-Silva A P, Oliveira E, Pinheiro C R, Nunes-Freitas A L, Abreu-Villac Y, Santana A C, Nascimento-Saba C C, Nogueira-Neto J F, Reis A M, Moura E G and Lisboa P C. Effects of tobacco smoke exposure during lactation on nutritional and hormonal profiles in mothers and offspring. *Journal of Endocrinology*. 209, 75–84, 2011.
394. Sarasin A, Schlumpf M, Müller M, et al. Adrenal-mediated rather than direct effects of nicotine as a basis of altered sex steroid synthesis in fetal and neonatal rat. *Reprod Toxicol* 17:153–162. 2003.
395. Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annual review of neuroscience*, 16: 403-43. 1993.
396. Schneider S, Schütz J. Who smokes during pregnancy? A systematic literature review of population-based surveys conducted in developed countries between 1997 and 2000. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 13: 138-147, 2008.
397. Schooling M, Kuh D. A lifecourse perspective on women's health behaviours. In Kuh D, Hardy R, eds. *A life course approach to women's health*. Oxford: Oxford University Press, 2002:279-303.
398. Schorling JB, Gutgesell M, Klas P, Smith D, Keller A. Tobacco, alcohol and other drug use among college students. *J Subst Abuse*. 1994;6(1):105-15.
399. Schultz W, Apicella P, Ljungberg T. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J Neurosci*. 1993 Mar;13(3):900-13.
400. Schultz W, Tremblay L, Hollerman JR. Reward prediction in primate basal ganglia and frontal cortex. *Neuropharmacology*. 1998 Apr-May;37(4-5):421-9. Review.
401. Schultz W. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*. 1998 Jul;80(1):1-27. Review.
402. 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.
403. Scragg R1, Reeder AI, Wong G, Glover M, Nosa V. Attachment to parents, parental tobacco smoking and smoking among Year 10 students in the 2005 New Zealand national survey. *Aust N Z J Public Health*. 2008 Aug;32(4):348-53.

404. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007 Jun;3(6):479-88. Review.
405. Senecky Y, Weiss N, Shalev SA, Peleg D, Inbar D, Chodick G e colaboradores. Alcohol consumption during pregnancy among women in Israel. *J.Popul.Ther.Clin.Pharmacol.* 18: e261-e272. 2011.
406. Shacka JJ, Robinson SE. Exposure to prenatal nicotine transiently increases neuronal nicotinic receptor subunit alpha7, alpha4 and beta2 messenger RNAs in the postnatal rat brain. *Neuroscience.* 1998; 84, 1151–1161.
407. Shen JX, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin.* 2009; 30, 673–680.
408. Shield KD, Parry C, Rehm J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use. *Alcohol Research Current Reviews.* 35:155–171, 2013.
409. Shoaib M, Swanner LS, Beyer CE, Goldberg SR, Schindler CW. The GABAB agonist baclofen modifies cocaine self-administration in rats. *Behav Pharmacol.* 1998 May;9(3):195-206.
410. Slawecki CJ, Thomas JD, Riley EP, Ehlers CL. Neurophysiologic consequences of neonatal ethanol exposure in the rat. *Alcohol.* 34: 187-196, 2004.
411. Slikker W Jr, Xu ZA, Levin ED, Slotkin TA. Mode of action: disruption of brain cell replication, second messenger, and neurotransmitter systems during development leading to cognitive dysfunction--developmental neurotoxicity of nicotine (Review). *Crit Rev Toxicol.* 35(8-9):703-11, 2005.
412. Slotkin TA, Lappi SE, Tayyeb MI, Seidler FJ. Chronic prenatal nicotine exposure sensitizes rat brain to acute postnatal nicotine challenge as assessed with ornithine decarboxylase. *Life Sci.* 49(9):665-70, 1991.
413. Slotkin TA, Orband-Miller L, Queen KL, et al. Effects of prenatal nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: maternal drug infusions via osmotic minipumps. *J Pharmacol Exp Ther* 240: 602–611. 1987.
414. Slotkin TA, Orband-Miller L, Queen KL. Development of [3H] nicotine binding sites in brain regions of rats exposed to nicotine prenatally via maternal injections or infusions. *J Pharmacol Exp Ther.* 242, 232–237, 1987.
415. Slotkin TA, Pinkerton KE, Garofolo MC, Auman JT, McCook EC, Seidler FJ. Perinatal exposure to environmental tobacco smoke induces adenylyl cyclase and alters receptor-mediated cell signaling in brain and heart of neonatal rats. *Brain Res.* 13;898(1):73-81, 2001.
416. Slotkin TA, Seidler FJ. Nicotine exposure in adolescence alters the response of serotonin systems to nicotine administered subsequently in adulthood. *Dev Neurosci,* 31:58-70. 2009.
417. Slotkin TA. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol Teratol* 24, 369–384, 2002.

418. Slotkin, T.A. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 369–384, 2002.
419. Slotkin TA. Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Jun;285(3):931-45.
420. Smith W, Weidler F, Slotkin T. Acute stimulation of ornithine decarboxylase in neonatal rat brain regions by nicotine: a central receptor-mediated process? *Developmental Brain Research.* 63:85–93. 1991.
421. Söderpalm 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 Aug;113(1-2):85-96. Review.
422. Sowell ER, Mattson SN, Thompson PM, Jernigan TL, Riley EP, Toga AW. Mapping callosal morphology and cognitive correlates: effects of heavy prenatal alcohol exposure. *Neurology* 2001; 57: 235-244.
423. Sparks JA1, Pauly JR. Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57Bl/6 mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1999 Jan;141(2):145-53
424. Spear L. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health* 24: 115-123, 2000.
425. Spohr HL, Willms J, Steinhausen HC. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *J Pediatr.* 150: 175-9, 179, 2007.
426. Stergachis, A., Scholes, D., Darlin, J. R. et al. Maternal cigarette smoking and the risk of tubal pregnancy. *Am J Epidemiol.* 133:332. 1991.
427. Stolerman IP, SHOAIB M. The neurobiology of tobacco addiction. *Trends in pharmacological science*, 12: 467-473, 1991.
428. Stratton K, Howe C, e Battaglia F. Fetal Alcohol Syndrome: diagnosis, epidemiology, prevention, and treatment. National Academic Press, Washington D.C., 1996.
429. Streissguth AP, Barr HM, Olson HC, Sampson PD, Bookstein FL, Burgess DM. Drinking during pregnancy decreases word attack and arithmetic scores on standardized tests: adolescent data from a population-based prospective study. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1994; 18: 248-254.
430. Streissguth AP, Bookstein FL, Sampson PD, Barr HM. Neurobehavioral effects of prenatal alcohol: Part III. PLS analyses of neuropsychologic tests. *Neurotoxicol.Teratol.* 1989; 11: 493-507.
431. Suckow MA. The laboratory mouse. Suckow MA, Danneman P, e Brayton C. CRC Press, New York, 2001.
432. Sulik KK. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 230: 366-375, 2005.

433. Suzuki K, Horiguchi T, Comas-Urrutia AC, Mueller-Heubach E, Morishima HO, Adamsons K. Placental transfer and distribution of nicotine in the pregnant rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol.* 1974; 119, 253–262.
434. Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull.* 1982 Jul-Dec;9(1-6):321-53.
435. Talhout R1, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health.* 2011 Feb;8(2):613-28.
436. Tassonyi E et al. The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Research Bulletin,* 57:133-50. 2002.
437. Taylor AN, Branch BJ, Kokka N. Neuroendocrine effects of fetal alcohol exposure. *Prog Biochem Pharmacol.* 1981;18:99-110. Review.
438. Thapar A, Fowler T, Rice F, Scourfield J, van den Bree M, Thomas H, Harold G, Hay D. Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry.* 2003 Nov;160(11):1985-9.
439. The world bank. Curbing the epidemic governments and the economics of tobacco control. World Bank. 17/12/1999.
440. The World Health Report. Global Status Report on Alcohol 2004. 1-68, 2004. WHO (2004) Global status report on alcohol. World Health Organization, Department of Mental Health and Substance Abuse; http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_status_report_2004_overview.pdf. accessed on: june 2014.
441. Theile, J. W., Morikawa, H., Gonzales, R. A., & Morrisett, R. A. (2008). Ethanol enhances GABAergic transmission onto dopamine neurons in the ventral tegmental area of the rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research,* 32, 1040e1048.
442. Theile, J. W., Morikawa, H., Gonzales, R. A., & Morrisett, R. A. (2011). GABAergic transmission modulates ethanol excitation of ventral tegmental area dopamine neurons. *Neuroscience,* 172, 94e103.
443. Thomas JD, Fleming And SL, Riley EP. MK-801 can exacerbate or attenuate behavioral alterations associated with neonatal alcohol exposure in the rat, depending on the timing of administration. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 25: 764-773, 2001.
444. Tizabi Y, Perry DC. Prenatal nicotine exposure is associated with an increase in [125I]epibatidine binding in discrete cortical regions in rats. *PharmacolBiochemBehav* 67:319–323. 2000.
445. Tizabi Y, Bai L, Copeland RL Jr, Taylor RE. Combined effects of systemic alcohol and nicotine on dopamine release in the nucleus accumbens shell. *Alcohol Alcohol.* 2007 Sep-Oct;42(5):413-6. Epub 2007 Aug 8.
446. Tolu S, Eddine R, Marti F, David V, Graupner M, Pons S, Baudonnat M, Husson M, Besson M, Reperant C, Zemdegs J, Pagès C, Hay YA, Lambolez B, Caboche

- J, Gutkin B, Gardier AM, Changeux JP, Faure P, Maskos U. Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Mol Psychiatry*. Mar;18(3):382-93. doi: 10.1038/mp.2012.83. Epub 2012 Jul 3.
447. 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 Sep;63(7):302-6.
 448. Tran TD, Cronise K, Marino MD, Jenkins WJ, Kelly SJ. Critical periods for the effects of alcohol exposure on brain weight, body weight, activity and investigation. *Behav. Brain Res*. 116: 99-110, 2000.
 449. Trauth JA et al. Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions. *Brain research*, 851: 9-19. 1999.
 450. True WR, Heath AC, Scherrer JF, Waterman B, Goldberg J, Lin N, Eisen SA, Lyons MJ, Tsuang MT. Genetic and environmental contributions to smoking. *Addiction*. 1997 Oct;92(10):1277-87.
 451. Uecker A, Nadel L. Spatial locations gone awry: object and spatial memory deficits in children with fetal alcohol syndrome. *Neuropsychologia* 1996; 34: 209-223.
 452. US DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH AND HUMAN SERVICES. The health consequences of smoking. *Nicotine Addiction. A report of the Surgeon General*. Washington. 1988.
 453. Valentine JD, Hokanson JS, Matta SG, Sharp BM (1997) Self-administration in rats allowed unlimited access to nicotine. *Psychopharmacology* 133:300–304
 454. Van Kammen WB, Loeber R, Stouthamer-Loeber M. Substance use and its relationship to conduct problems and delinquency in young boys. *J Youth Adolesc*. 1991 Aug;20(4):399-413
 455. Villégier AS, Ge´rard Blanc, Jacques Glowinski, Jean-Pol Tassin Transient behavioral sensitization to nicotine becomes long-lasting with monoamine oxidases inhibitors *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 76 (2003) 267–274
 456. Viveros MP, Marco EM, Llorente R, Lamota L. The role of the hippocampus in mediating emotional responses to nicotine and cannabinoids: a possible neural substrate for functional interactions (Review). *Behav Pharmacol*. 18(5-6):375-89, 2007.
 457. Volkow ND, Fowler JS, Hitzemann R, Wang GJ. Neurochemical mechanisms underlying responses to psychostimulants. *NIDA Res Monogr*. 159:322-48, 1996.
 458. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. The addicted human brain viewed in the light of imaging studies: brain circuits and treatment strategies (Review) *Neuropharmacology*. 47 Suppl 1:3-13, 2004.
 459. von Ziegler NI, Schlumpf M, Lichtensteiger W. Prenatal nicotine exposure selectively affects perinatal forebrain aromatase activity and fetal adrenal function in male rats. *Brain Res Dev Brain Res* 62:23–31. 1991.

460. Wang HL, Morales M. Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci.* 29(2):340-58, 2009.
461. Watkins, S. S., Koob, G. F., & Markou, A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: Acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine & Tobacco Research*, 2, 19–37, 2000.
462. Weinberg N, Dielman T, Mandell W, Shope J. 1994. Parental drinking and gender factors in the prediction of early adolescent alcohol use. *International Journal of Addictions* 29:89–104.
463. Weitzman ER, Chen YY. The co-occurrence of smoking and drinking among young adults in college: national survey results from the United States. *Drug Alcohol Depend.* 2005 Dec 12;80(3):377-86.
464. Welch-Carre E. The neurodevelopmental consequences of prenatal alcohol exposure. *Adv. Neonatal Care.* 5: 217-229, 2005.
465. West RJ, Hajek P, Belcher M. Severity of withdrawal symptoms as a predictor of outcome of an attempt to quit smoking. *Psychol Med.* 19:981–985, 1989.
466. Wills TA, Vaccaro D, McNamara G. Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse* 6:1-20. 1994.
467. Wilson, E. W. The effect of smoking in pregnancy on the placental coefficient. *N Zealand Med J.* 74:384. 1971.
468. Wise RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol.* 1996 Apr;6(2):243-51. Review.
469. Wonnacott S, Sidhpura N, Balfour DJ. Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Current opinion in pharmacology*, 5:53-9. 2005.
470. Wonnacott, S. The paradox of nicotine acetylcholine receptor up regulation by nicotine. *Trends Pharmacol Sci.* 11:216. 1990.
471. Woodward, A., Gruguriovich, N., Philipryan, A. Breast feeding and smoking hygiene. Major influences on cotinine in urine of smokers infants. *J Epidemiol Comm Health.* 40:309. 1986.
472. Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JÁ. Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 23:3176-3186, 2003.
473. World Health Organization (WHO) – Quadro de Convenção do Controle do Tabaco. Dia Mundial Sem Tabaco. Tabaco e Pobreza – Um Círculo Vicioso. 31 de maio de 2004.
474. _____. Report on the global tobacco epidemic, 2013 Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship WHO 2014 WHO, 2014.

475. _____. Atlas on substance use: resources for the prevention and treatment of substance use disorders. 2010.
476. _____. World Drug Report. 2012.
477. Wozniak DF, Hartman RE, Boyle MP, Vogt SK, Brooks AR, Tenkova T e colaboradores. Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. *Neurobiol.Dis.* 2004; 17: 403-414.
478. Wu PH, Coultrap S, Browning MD, Proctor WR. Correlated changes in NMDA receptor phosphorylation, functional activity, and sedation by chronic ethanol consumption. *J.Neurochem.* 2010; 115: 1112-1122.
479. Wüllner U et al. Smoking upregulates alpha4beta2* nicotinic acetylcholine receptors in the human brain. *Neurosci Lett.*, 430: 34-37, 2008.
480. Xi ZX, Stein EA. Baclofen inhibits heroin self-administration behavior and mesolimbic dopamine release. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Sep;290(3):1369-74.
481. Xiao C et al. Nicotine modulates GABAergic transmission to dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta. *Acta Pharmacol Sin.* 30: 851-8. 2009.
482. Xiao C, Shao MX, Olive MF, Griffin WC, Li K-Y, Krnjević K, Zhou C, Ye J-H. Ethanol Facilitates Glutamatergic Transmission to Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area. 34(2): 307–318. 2009
483. Xu W et al. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the national academy of science of the USA*, 96: 5746-511, 1999a.
484. Xu W et al. Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the beta2 and the beta4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *The journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience*, 19: 9298-305, 1999b.
485. Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, et al. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5746–5751. 1999.
486. Yates WR, Cadoret RJ, Troughton EP, Stewart M, Giunta TS (1998) Effect of fetal alcohol exposure on adult symptoms of nicotine, alcohol, and drug-dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 22:914–920
487. Yates WR, Cadoret RJ, Troughton EP, Stewart M, Giunta TS. Effect of fetal alcohol exposure on adult symptoms of nicotine, alcohol, and drug dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998 Jun;22(4):914-20.
488. Yoshinaba, K., Rice, C., Krenn, J. et al. Effects of nicotine on early pregnancy in the rat. *Biol Reproduction.* 21:294. 1979.

489. Young S, Sherrill DL, Arnott J, Diepeveen D, LeSouëf PN, Landau LI. Parental factors affecting respiratory function during the first year of life. *Pediatr Pulmonol.* 2000 May;29(5):331-40.
490. Yu KD, Liu Q, Wu J, Lukas RJ. Kinetics of desensitization and recovery from desensitization for human $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in SH-EP1 cells. *Acta Pharmacol Sin* 30:805-817, 2009.
491. Zhang X, Liu C, Miao H, Gong ZH, Nordberg A. Postnatal changes of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunits genes expression in rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 16:507-518. 1998.
492. Zhao R, Chen H, Sharp BM. Nicotine-induced norepinephrine release in hypothalamic paraventricular nucleus and amygdala is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in the nucleus tractus solitarius. *J Pharmacol Exp Ther.*, 320:837-44. 2007.
493. Zhou X, Nonnemaker J, Sherril B, Gilsenan AW, Coste F, West R. Attempts to quit smoking and relapse: factors associated with success or failure from the ATTEMPT cohort study. *Addict Behav* 34:365-373. 2009.