



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

Anna Caroline de Carvalho Graça

**Tabaco e álcool durante a adolescência: efeitos na memória e aprendizado e
no sistema colinérgico central**

Rio de Janeiro

2012

Anna Caroline de Carvalho Graça

**Tabaco e álcool durante a adolescência: efeitos na memória e aprendizado
e no sistema colinérgico central**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, 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

2012

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

G729 Graça, Anna Caroline de Carvalho.
Tabaco e álcool durante a adolescência: efeitos na memória e aprendizado
e no sistema colinérgico central / Anna Caroline de Carvalho Graça. – 2012.
97 f.

Orientadora: Yael de Abreu Villaça.
Coorientador: Anderson Ribeiro Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em
Biotecnologia.

1. Consumo de bebidas alcoólicas. 2. Adolescência – Álcool – Teses.
3. Fumo – Teses. 4. Tabagismo – Efeitos adversos. 5. Memória – Teses. 6.
Aprendizagem – Teses. I. Villaça, Yael de Abreu. II. Carvalho, Anderson
Ribeiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia
Roberto Alcântara Braga. IV Título.

CDU 616-053.7:613.81

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

Assinatura

Data

Anna Caroline de Carvalho Graça

**Tabaco e álcool durante a adolescência: efeitos na memória e aprendizado
e no sistema colinérgico central**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 05 de março de 2012.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador:

Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Andréa Monte Alto Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Jesus Landeira Fernandez
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

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

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

Às minhas tias Teresinha, pois sem ela não teria tido ferramentas para esta conquista e Solange que com sua alegria em todos os momentos me mostra como viver a vida.

A minha avó e afilhado Igor por todo carinho, amor e preocupação diários.

Ao meu avô pelo carinho, exemplo e alegria no olhar inesquecíveis. Sei que você está olhando por mim aonde quer que esteja. Saudades eternas!

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

À minha orientadora Yael por todo apoio e confiança durante a realização desta dissertação, mesmo com os diversos contra tempos que ocorreram. Aprendi e aprenderei muito com você!

Ao meu co-orientador Anderson pelas inúmeras ajudas, paciência, atenção e carinho. Você me ensina a cada dia o que é humanidade.

Ao professor Alex, agradeço a paciência, a ajuda, o apoio e os ensinamentos em diversas áreas.

Ao professor Cláudio por fazer o ambiente do laboratório ser agradável, divertido e pelos ensinamentos.

Em especial aos amigos e colegas de trabalho que participaram da confecção deste trabalho. Anderson, Fê e Victor, obrigada por dividirem comigo essa tarefa! Cada um de vocês me ensinou muito!

Aos meus amigos do laboratório Jú, Fabi, Jú da Mabel, Dani, André, Sylvio, Carla, Aninha, Natalie, Cris, Monique, Ulisses, Mabel, Ana, Jemima e Mônica por fazerem dos meus dias no laboratório os mais agradáveis e engraçados possíveis.

À todos os meus amigos por acreditarem que sou capaz.

A perseverança em torno de qualquer
objetivo é recurso valioso para que seja atingida a
meta que se busca.

Divaldo P. Franco

RESUMO

GRAÇA, Anna Caroline Carvalho. *Tabaco e álcool durante a adolescência: efeitos na memória e aprendizado e no sistema colinérgico central*. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Estudos demonstram uma forte relação entre o fumo e o consumo de álcool, de forma que a co-ocorrência de alcoólicos e fumantes é muito frequente. Esse estudo buscou avaliar os efeitos do tabaco, etanol e da dupla exposição tabaco+etanol na memória/aprendizado e no sistema colinérgico central de camundongos durante a exposição e durante o período de retirada das drogas. Do 30º ao 45º dia de vida pós-natal (PN30-PN45), camundongos Suíços foram expostos à fumaça de cigarros gerada a partir da queima de cigarros para pesquisa (0,7 mg de nicotina, 9,4 mg de alcatrão e 12 mg de CO) em uma máquina de fumaça de cigarro durante 8h/dia e/ou a injeções i.p. de etanol (2g/kg, 25%, v/v) em dias alternados. Assim, foram utilizados 4 grupos experimentais: FUM+ETAN (exposição à fumaça de cigarros e injeção i.p. de etanol); FUM (exposição à fumaça de cigarros e à salina i.p), ETAN (etanol i.p. e exposição a ar) e VEH (animais receberam salina i.p e exposição a ar). Ao final do período de exposição (PN44-45), durante um curto período de retirada das drogas (PN49-50) e fase adulta (PN74-75) esses animais foram submetidos ao teste comportamental da Esquiva Passiva, que avalia memória/aprendizado. No primeiro dia de teste (PN44/ PN49/ PN74), os animais são colocados sobre uma plataforma e espera-se até 3 minutos para que desçam sendo administrado um choque (0,3 mA, 3 segundos). 3hrs (T3) e 24hrs (T24) depois, o mesmo ocorre porém, sem a administração do choque. A latência para descer da plataforma foi utilizada como índice de memória/aprendizado. Após o último teste, os animais são sacrificados e os cérebros coletados para a análise posterior. Para identificar efeitos das drogas no sistema colinérgico central avaliamos a atividade da colina acetiltransferase (ChAT); ligação do [3H]hemicholinium-3 (HC-3) ao transportador pré-sináptico de colina e a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo. Observamos que durante a exposição, os animais dos grupos ETAN, FUM e FUM+ETAN apresentaram menor latência para descer da plataforma em T3, o que também foi observado em T24 nos grupos FUM e FUM+ETAN. No curto período de retirada, em T24 verificamos que camundongos machos FUM+ETAN apresentaram menor tempo de latência para descer da plataforma. Na fase adulta, não encontramos diferenças significativas em nenhuma das sessões de teste. A exposição às drogas não provocou alteração na ChAT, HC-3 e AChE. A atividade da AChE não sofreu alteração nos outros dois momentos analisados. Fêmeas do grupo FUM apresentaram menor atividade da ChAT após cinco dias de retirada das drogas, enquanto que na fase adulta, a redução da atividade foi observada nos grupos FUM, ETAN e FUM+ETAN. Em relação ao HC-3, no curto período de retirada, machos FUM+ETAN apresentaram maior ligação do mesmo ao transportador de colina, mesmo efeito observado na fase adulta em animais machos e fêmeas dos grupos ETAN e FUM. Assim, fumaça de cigarro, etanol e a exposição combinada durante a adolescência de camundongos afetam negativamente a performance no teste de memória/aprendizado de Esquiva Passiva, e, de forma independente, os marcadores colinérgicos analisados.

Palavras-chave: Adolescência. Tabaco. Álcool. Memória. Camundongo.

ABSTRACT

GRAÇA, Anna Caroline Carvalho. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice: effects in memory and learning and in cholinergic system. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Studies show a strong relationship between smoking and alcohol consumption, so that the co-occurrence of alcohol and smoking is very common. This study evaluated the effects of tobacco, ethanol and double exposure to tobacco + ethanol in memory/ learning and central cholinergic system of mice during exposure and withdrawal. From the 30th to the 45th postnatal day (PN30-PN45), Swiss mice were exposed to cigarette smoke generated from research cigarettes (0.7 mg of nicotine, 9.4 mg of tar and 12 mg of CO) in a cigarette smoke machine 8h/day and/or i.p. ethanol injections (2g/kg, 25%, v/v) on alternate days. For this study four experimental groups were used: SMK + ETOH (animals exposed to cigarette smoke and i.p. ethanol injections), SMK (exposure to cigarette smoke and i.p. saline), ETOH (i.p. ethanol and air exposure) and VEH (animals received ip saline and air exposure). At the end of the period of exposure (PN44-45) during a short period of drug withdrawal (PN49-50) and at adulthood (PN74-75) these animals were submitted to the Passive Avoidance behavioral test, which evaluates memory / learning. In the first testing day (PN44 / PN49 / PN74), animals are placed on a platform and are allowed 3 min to descend from it, at which time they receive a foot shock (0.3 mA, 3 s). Three (T3) and 24h (T24) after the initial testing, animals are retested (shock is not administered). The latency to fall of platform was used as an index of memory / learning. After the last test, animals are sacrificed and the brains collected for further analysis. To investigate the central cholinergic system we assessed choline acetyltransferase (ChAT) activity, binding of [3H] hemicholinium-3 (HC-3) to the presynaptic choline transporter and the acetylcholinesterase (AChE) activity in hippocampus. We found that during exposure, ETOH, FUM, and SMK + ETOH groups presented lower latency to descend from the platform at T3, which was also observed at T24 for SMK and SMK + ETOH groups. In the short period of withdrawal, we found that at T24 male mice from SMK + ETOH group presented shorter latency to descend from the platform. At adulthood, we found no significant differences in the Passive Avoidance test. During exposure, there were no changes in ChAT, HC-3 and AChE. There were no changes in AChE activity in the other two analyzed time points. Females from the SMK group had lower ChAT activity at five days of withdrawal, whereas at adulthood, the decreased activity was observed in SMK, ETOH and SMK + ETOH groups. Regarding HC-3 binding, in the short period of withdrawal, males from the SMK + ETOH showed increased binding, the same effect observed at adulthood in male and female mice from ETOH and SMK groups. Thus, cigarette smoke, ethanol and the combined exposure during adolescence of mice negatively affect performance in the Passive Avoidance memory / learning test and the central cholinergic system.

Keywords: Adolescence. Tobacco. Alcohol. Memory. Mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Alguns dos compostos presentes no cigarro.....	18
Figura 2 - Consumo per capita de álcool registrado em 2003-2005.....	22
Figura 3 - Foto da máquina de fumaça de cigarro.....	37
Quadro 1 - Distribuição de camundongos por tratamento, sexo e idade.....	39
Figura 4 - Foto do equipamento do Teste da Esquiva Passiva.....	40
Figura 5 - Esquema ilustrativo dos marcadores da atividade colinérgica.....	41
Figura 6 - Peso corporal de todos os animais dos quatro grupos experimentais, machos e fêmeas, antes do início do tratamento.....	48
Figura 7 - Peso corporal de todos os machos dos quatro grupos experimentais durante o tratamento.....	49
Figura 8 - Peso corporal de todas as fêmeas dos quatro grupos experimentais durante o tratamento.....	50
Figura 9 - Latência para descer da plataforma na segunda sessão experimental (T3) no Teste da Esquiva Passiva, durante a exposição (PN44).....	51
Figura 10 - Latência para descer da plataforma na terceira sessão experimental (T24) no Teste da Esquiva Passiva, durante a exposição (PN45).....	52
Figura 11 - Latência para descer da plataforma na segunda sessão experimental (T3) no Teste da Esquiva Passiva, durante a retirada das drogas (PN49).....	53
Figura 12 - Latência para descer da plataforma, relativa aos machos, na terceira sessão experimental (T24) no Teste da Esquiva Passiva, durante o período de retirada das drogas (PN50).....	54
Figura 13 - Latência para descer da plataforma, relativa às fêmeas, na terceira sessão experimental (T24) no Teste da Esquiva Passiva, durante o período de retirada das drogas (PN50).....	55
Figura 14 - Latência para descer da plataforma na segunda sessão experimental (T3) no Teste da Esquiva Passiva, durante a fase adulta dos animais (PN75).....	56
Figura 15 - Latência para descer da plataforma na terceira sessão experimental (T24) no Teste da Esquiva Passiva, durante a fase adulta dos animais (PN75).....	56
Figura 16 - Atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) durante a exposição das drogas.....	57
Figura 17 - Atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) em fêmeas, durante	

curto período de retirada das drogas (PN50).....	58
Figura 18 - Atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) em machos, durante curto período de retirada das drogas (PN50).....	58
Figura 19 - Atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) em fêmeas, durante a fase adulta dos animais (PN75).....	59
Figura 20 - Atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) em machos, durante a fase adulta dos animais (PN75).....	60
Figura 21 - Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina durante a exposição às drogas (PN45).....	61
Figura 22 - Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina em fêmeas, durante curto período de retirada das drogas (PN50).....	62
Figura 23 - Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina em machos, durante curto período de retirada das drogas (PN50).....	62
Figura 24 - Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina durante a fase adulta dos animais (PN75).....	63
Figura 25 - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) durante o período de exposição das drogas (PN45).....	64
Figura 26 - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) durante o curto período de retirada das drogas (PN50).....	65
Figura 27 - Atividade da acetilcolinesterase (AChE) durante a fase adulta (PN75).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Uso de álcool, distribuídos segundo sexo e faixa etária de 8.589 entrevistados em 107 cidades do Brasil	16
Tabela 2 - Uso de tabaco, distribuídos segundo sexo e faixa etária de 8.589 entrevistados em 107 cidades do Brasil	16
Tabela 3 - Características do cigarro para pesquisa do tipo 3R4F	37
Tabela 4 - Concentração de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono (CO) em cigarros industrializados	37
Tabela 5 - Animais utilizados para a quantificação de cotinina plasmática	45
Tabela 6 - Animais utilizados para a quantificação de etanol plasmático	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

i.p.	Intraperitoneal
PN	dia de vida pós-natal
PN45	45° dia pós-natal
PN50	50° dia pós-natal
PN75	75° dia pós-natal
ChAT	Colina acetiltransferase
HC-3	Hemicholinium-3
AChE	Acetilcolinesterase
nAChRs	Receptor nicotínico colinérgico
Ma	Miliampére
cm	Centímetros
min	Minutos
ANOVA	Análise de Variância
P	Valor de prova
ETAN	Etanol
FUM	Fumaça
FUM+ETAN	Fumaça + etanol
VEH	Veículo
Mg/cigt	Miligramas por cigarro
Hrs	Horas
S	Segundos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	TABACO	17
1.1	Nicotina	19
2	ÁLCOOL	21
3	O CO-ABUSO	25
4	ADOLESCÊNCIA	28
5	EXPOSIÇÃO COMBINADA A NICOTINA E ETANOL	31
6	OBJETIVOS	34
6.1	Gerais	34
6.2	Específicos	34
7	MATERIAIS E MÉTODOS	35
7.1	Animais	35
7.2	Exposição às drogas	36
7.2.1	<u>Exposição à fumaça de cigarro</u>	36
7.2.2	<u>Exposição ao Etanol</u>	38
7.2.2	<u>Formação dos grupos experimentais</u>	38
7.3	Teste comportamental	39
7.4	Análise neuroquímica	41
7.4.1	<u>Preparação do tecido</u>	41
7.4.2	<u>Atividade da AChE</u>	43
7.4.3	<u>Transporte pré-sináptico de colina</u>	44
7.4.4	<u>Quantificação da proteína tecidual total e proteína de membrana</u>	45
7.5	Cotina e etanol em soro	45
7.6	Análise estatística	47
8	RESULTADOS	48
8.1	Efeitos da exposição no peso dos animais	48
8.2	Cotina e etanol plasmáticos	50
8.3	Teste comportamental	51
8.4	Análise neuroquímica	57
8.4.1	<u>Colina Acetiltransferase (ChAT)</u>	57
8.4.2	<u>Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina</u>	60

8.4.3	<u>Acetilcolinesterase (AChE)</u>	64
9	DISCUSSÃO	67
9.1	Escolha do tipo de cigarro para a exposição	67
9.2	Dose de etanol	68
9.3	Concentração de etanol e cotinina no sangue	68
9.4	Alterações no peso dos animais	69
9.5	Efeitos na memória/aprendizado	70
9.6	Efeitos no sistema colinérgico	74
	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	80

INTRODUÇÃO

Tabagismo

É de tempos imemoriais o costume dos silvícolas americanos de fumar tabaco nas cerimônias religiosas, fazendo das Américas o berço a partir do qual se disseminou o tabaco. É um enigma que tantas culturas indígenas espalhadas neste continente, as quais dificilmente podiam contactar-se, vivenciassem ritual semelhante mágico-religioso, sagrado, no qual o sacerdote, cacique ou pajé e seus circunstantes entravam em transe aspirando o fumo do tabaco. Quando Colombo aportou nestas regiões, plantava-se tabaco em todo o continente. O primeiro contato do mundo civilizado com a nicotina ocorreu no século XVI, chegando à Europa por quatro caminhos: Espanha, Portugal, França e Inglaterra. Cinquenta anos após sua chegada, praticamente se fumava cachimbo em todo o continente: nobres, plebeus, soldados e marinheiros. Para os favorecidos economicamente, criaram-se as “Tabagies”, onde homens e mulheres se reuniam entre amigos ou familiares, fumando longos cachimbos. Rapidamente o tabaco integrou-se a todas as populações do mundo civilizado. Tapeçarias dos séculos XVII e XVIII, flamencas, francesas e de outros países, mostram personagens com cachimbos. Pintores célebres de toda Europa, desses referidos séculos, reproduziram em suas telas, personagens fumando. Tudo isso atestando como o tabagismo rapidamente se difundiu, constituindo um dos maiores fenômenos de transculturação no mundo (Rosemberg, 2005).

Atualmente, o uso do tabaco é a principal causa mundial de morte evitável. Essa prática mata cerca de 6 milhões de pessoas e causa prejuízos econômicos de centenas de bilhões de dólares em todo o mundo, a cada ano. A maioria destas mortes ocorrem em países de baixa e média renda, e esta disparidade deve aumentar ainda mais ao longo das próximas décadas. Se as tendências atuais continuarem, em 2030 o uso do tabaco irá matar mais de 8 milhões de pessoas no mundo a cada ano, com 80% dessas mortes prematuras entre pessoas que vivem em países de baixa e média renda. Ao longo do século 21, o uso de tabaco pode matar um bilhão de pessoas ou mais. Isto porque, apesar da adoção de rigorosas campanhas antifumo em muitos países, atualmente as pessoas fumam mais do que durante qualquer outra época da história humana. De fato, as taxas de prevalência de tabagismo estão aumentando progressivamente principalmente entre os jovens e a expansão global da epidemia do tabaco é projetada para um futuro próximo (WHO, 2011a; Dinas et al., 2011).

Consumo de álcool

Acredita-se que a bebida alcoólica teve origem na Pré-História, durante o Período Neolítico. Há aproximadamente 10.000 anos o ser humano passou a ingerir e atribuir diferentes significados ao uso do álcool, a partir de um processo de fermentação natural (CISA, 2011). Segundo o Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA), os solos da Grécia e de Roma eram ricos para a produção de uvas, portanto para a produção de vinhos. O vinho fazia parte das celebrações sociais e religiosas dos gregos e romanos, mas a embriaguez e o abuso de álcool eram censurados por esses povos. Os egípcios acreditavam que as bebidas alcoólicas combatiam germes e parasitas, deixando documentado as etapas de fabricação e comercialização do vinho e da cerveja para tal. Durante a Idade Média a Intoxicação Alcoólica passou a ser considerada um pecado pela Igreja. Já na Idade Moderna, começou haver a fiscalização dos cabarés e tabernas, sendo estipulado horário para funcionamento, pois nestes locais o uso de álcool ocorria durante os debates políticos. No fim do século 18, o uso excessivo de bebida passa a ser visto por alguns como doença. Durante o século 20, países começam a determinar a maioridade para o consumo de álcool. E em 1920 o estado Americano decreta a Lei Seca, que se caracterizou pela proibição da venda, troca, fabricação, transporte, importação, exportação, distribuição, posse e consumo de álcool, por 12 anos.

Somente com a primeira edição do DSM-I (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) o alcoolismo passou a ser tratado como doença. No ano de 1967, o conceito de doença do alcoolismo foi incorporado pela Organização Mundial de Saúde à Classificação Internacional das Doenças (CID-8), a partir da 8ª Conferência Mundial de Saúde. No CID-8, os problemas relacionados ao uso de álcool foram inseridos dentro de uma categoria mais ampla de transtornos de personalidade e de neuroses. Esses problemas foram divididos em três categorias: dependência, episódios de beber excessivo (abuso) e beber excessivo habitual. A dependência de álcool foi caracterizada pelo uso compulsivo de bebidas alcoólicas e pela manifestação de sintomas de abstinência após a cessação do uso de álcool (CISA, 2011).

No Brasil

Segundo levantamento do IBGE realizado em 1989, havia no Brasil 30.642.562 tabagistas (33% do total da população), destes 12.404.136 eram mulheres (IBGE, 1989).

Porém, ao longo dos anos essa porcentagem vem diminuindo, em 2006 o percentual de fumantes era de 16,2%. Já em 2009, esse percentual chegou a 15,5%, segundo dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel; Ministério da Saúde – Brasil), que entrevistou 54 mil adultos. Esta pesquisa aponta que 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%). Pelo menos 2,6 mil não-fumantes morrem no Brasil por ano devido a doenças provocadas pelo tabagismo passivo. Fumantes passivos têm 30% de chances a mais de desenvolver câncer de pulmão e 24% a mais de sofrer infarto e doenças cardiovasculares do que os que não são (Ministério da Saúde, 2009). De acordo com este estudo, 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%. No município do Rio de Janeiro, no ano 2000, apurou-se que 20% das mulheres e 23% dos homens eram fumantes (Cavalcante, 2001).

No Brasil, apesar da escassez de estudos, estima-se que 10% da população seja dependente do etanol (Laranjeiras et al., 1997; Moreira et al., 1996). No país, o padrão de consumo de bebidas alcoólicas é preocupante, principalmente, entre adolescentes e jovens. Estudo em escolares da rede pública de ensino fundamental e médio, no conjunto das 27 capitais brasileiras, realizado em 2004, mostrou que a média de idade para a iniciação do álcool era de 12,5 anos (Galduróz et al., 2005). Segundo dados da Pesquisa Nacional da Saúde do Escolar (Pense), realizada pelo IBGE no ano de 2009, dos estudantes pesquisados, 24,2% já experimentaram o cigarro alguma vez na vida e 6,3% o consumiram alguma vez nos 30 dias anteriores à pesquisa. O consumo de bebida alcoólica era mais disseminado do que o fumo: 71,4% já haviam experimentado álcool alguma vez, sendo que 27,3% disseram ter consumido no mês anterior à pesquisa. Quase 20% declararam ter obtido a bebida em supermercados ou bares e 12,6% deles na própria casa. Cabe ainda ressaltar, que 22,1% dos escolares que participaram da pesquisa relataram que já haviam se embriagado (Pesquisa Nacional da Saúde do Escolar, 2009). Em estudo realizado por Galduróz e colaboradores, com 8.589 pessoas, entre homens e mulheres, são mostradas as porcentagens e a população estimada que fez uso na vida de tabaco e álcool (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Uso de álcool, distribuídos segundo o sexo e as faixas etárias dos 8.589 entrevistados, nas 107 cidades do Brasil com mais de 200 mil habitantes

Faixa Etária (anos)/Sexo	Observado (%)
12 a 17	48,3
M	52,2
F	44,7
18 a 24	73,2
M	78,3
F	68,2
25 a 34	76,5
M	85,6
F	67,6
> 35	70,1
M	82,1
F	59,5
Total	68,7
M	77,3
F	60,6

Fonte: Galduróz et al., 2005.

Tabela 2. Uso de tabaco, distribuídos segundo o sexo e as faixas etárias dos 8.589 entrevistados, nas 107 cidades do Brasil com mais de 200 mil habitantes

Faixa Etária (anos)/Sexo	Observado (%)
12 a 17	15,7
M	15,2
F	16,2
18 a 24	37,7
M	42,8
F	32,6
25 a 34	40,0
M	43,9
F	36,1
> 35	53,0
M	61,4
F	45,4
TOTAL	41,1
M	46,2
F	36,3

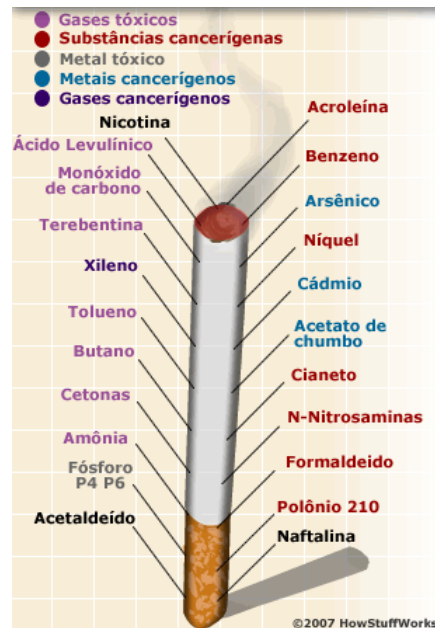
Fonte: Galduróz et al., 2005.

1 TABACO

"De um pequeno prazer vem um longo arrependimento"
Provérbio Francês

A folha do tabaco contém complexa mistura de componentes químicos, como: ácidos graxos, isoprenos, ésteres e minerais inorgânicos. Desta forma, a fumaça resultante da queima do tabaco é bastante complexa e dinâmica, sendo uma mistura heterogênea de gases, vapores e partículas líquidas. Apresenta aproximadamente 4800 constituintes identificados (Figura 1), entretanto estima-se que o número de espécies não identificadas seja dez vezes maior que o número dos constituintes identificados (Adam et al., 2006; Araújo et al., 2004). A fumaça do cigarro é um aerossol que contém gases e partículas materiais suspensas com substâncias divididas entre estas duas fases: fase gasosa e fase particulada. A primeira é composta de aproximadamente 400 à 500 compostos, dentre eles nitrogênio, dióxido de carbono, monóxido de carbono, argônio e metano. A maioria daqueles compostos da fase gasosa apresentam-se em concentrações traços. A grande maioria dos constituintes da fumaça aparecem na fração particulada, segunda fase, que é compreendida principalmente de múltiplos compostos orgânicos (Adam et al., 2006). O alcatrão, conhecido como um condensado marrom amarelado formado com a queima do cigarro, contém toda a fase particulada da fumaça, assim como os componentes condensáveis da forma gasosa. A quantidade de alcatrão da fumaça de um cigarro está entre 3 e 40mg, variando essa quantidade de acordo com as condições de queima e de condensação, tamanho do cigarro, uso ou não de filtro, conteúdo do cigarro, peso e tipo do tabaco (Araújo et al., 2004).

Figura 1. Alguns dos compostos presentes no cigarro



Fonte: <http://anarcofagia.com/paraparardefumar/substancias-do-cigarro/>

O fumo é um sério problema de saúde pública (Centers for Disease Control and Prevention, 2002; Zvolensky et al., 2005). O consumo de tabaco é universalmente reconhecido como estando associado a diversas desordens entre elas câncer, danos cardiovasculares, pulmonares e alterações gastrointestinais (Chen et al., 2002; Gritz et al., 2005; Jindal et al., 2004; Leone, 2005; Thomas et al., 2005). Sabe-se que o tabagismo está relacionado a, no mínimo, 30% de todas as mortes por câncer. É fator de risco para o aparecimento dos carcinomas de pulmão, boca, faringe, laringe, esôfago, estômago, pâncreas, cérvix uterina, rim e bexiga. A morbidade por doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença péptica e outras afecções também é mais elevada entre tabagistas (Balbani et al., 2005). Adicionalmente, há consenso que o tabaco é prejudicial à saúde de fetos e crianças (Witschi et al., 1997, Cornelius and Day, 2000). Em países desenvolvidos, a prevalência de fumo varia de 11 a 35% em mulheres grávidas (MMWR 2004, Schneider e Schütz, 2008), sendo que estes percentuais podem ser ainda maiores devido ao fato de que grávidas frequentemente não admitem que estão fumando (England et al., 2007). Estes dados sugerem que os números devem ser também significativos em países em desenvolvimento como o Brasil.

Dados epidemiológicos revelam que tem sido encontrada alta taxa de fumantes entre indivíduos com desordens psiquiátricas, incluindo aqueles com desordens de ansiedade (Lasser et al., 2000). Algumas evidências dão suporte à idéia de que a ansiedade é um sintoma que aumenta a probabilidade de se iniciar o hábito de fumar (Morissete et al., 2007). Estudos com fumantes adultos têm mostrado que o tabaco pode reduzir a ansiedade, sendo que este efeito é normalmente atribuído à nicotina presente nos cigarros (Kassel e Unrod, 2000). Assim, tem sido sugerido que fumantes continuam a fumar a fim regular seu estado de ansiedade (Picciotto et al., 2002; Gilbert et al., 1989; Pomerleau, 1986). Em contraste, fumantes adolescentes relatam aumento dos níveis de ansiedade durante a exposição, apesar de ser sugerido que a ansiedade também é sintoma de retirada da nicotina (Hughes et al., 2000; Parrot, 2003). Como tem sido descrito que os níveis de ansiedade desempenham papel na continuidade do vício, é razoável sugerir que os níveis de ansiedade associados com o fumo e abstinência podem desempenhar importante papel no uso de tabaco pelos adolescentes.

1.1 Nicotina

“Mais que o negócio de vender cigarros, a indústria tabaqueira tem por objetivo a venda atrativa de nicotina”.

Brown and Williamson, subsidiária norte-americana
Da British American Tobacco, 1963

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

A nicotina tem sido descrita como sendo um dos componentes ativos da fumaça do cigarro responsável por uma grande variedade de efeitos no sistema nervoso que resultam do consumo de tabaco (Benowitz, 1992; Dani and Heinemann, 1996). A nicotina induz tolerância e dependência pela ação nas vias dopaminérgicas centrais, levando às sensações de prazer e recompensa mediadas pelo sistema límbico. É um estimulante do sistema nervoso central

(SNC), aumenta o estado de alerta e reduz o apetite. A diminuição de 50% no consumo da nicotina pode desencadear sintomas de abstinência nos indivíduos dependentes: ansiedade, irritabilidade, distúrbios do sono, aumento do apetite, alterações cognitivas e fissura pelo cigarro (Balbani e Montovani, 2005). Está estabelecido que a nicotina é neuroteratogênica, afetando o cérebro pela interferência com mecanismos de mitose e diferenciação, causando alterações na axonogênese e sinaptogênese e conseqüentemente comprometendo a atividade sináptica e comportamento (Slikker et al., 2005; Slotkin, 2002). Estudos indicam que ações da nicotina são responsáveis pelas bases farmacológicas do vício ao cigarro e a outras formas de exposição ao tabaco (US Department of Health and Human Services, 1988; Royal College of Physicians, 2000).

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

Apesar da escassez de informações sobre os efeitos centrais da exposição ao tabaco em animais experimentais adolescentes, há um crescente número de trabalhos em modelos experimentais indicando que a nicotina causa danos ao cérebro adolescente, o que sugere que a nicotina afeta vias neuroquímicas que são particularmente sensíveis durante este período do desenvolvimento. Estudos recentes demonstraram efeitos comportamentais e bioquímicos da nicotina durante a adolescência de camundongos. Como exemplos, o tratamento com nicotina durante a adolescência desencadeia intensa e persistente *upregulation* de receptores nicotínicos assim como intensa redução na atividade colinérgica e catecolaminérgica do mesencéfalo, uma região que tem sido associada a mecanismos de recompensa e dependência; assim como no córtex e no hipocampo, regiões associadas a funções cognitivas (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2003b, 2004; Trauth et al., 2000a, 2001). Além destas alterações, quando oferecida livre escolha entre água e uma solução contendo nicotina, camundongos adolescentes preferem beber a solução de nicotina (Abreu-Villaça et al., 2006; Adriani et al., 2002). A exposição à nicotina na adolescência causa alterações comportamentais que diferem das alterações causadas pela exposição à nicotina na idade adulta (Adriani et al. 2004; Faraday et al., 2001,2003; Levin 1999; Smith et al., 2006; Trauth et al., 2000b; Vastola et al., 2002) assim como mudanças persistentes na atividade do EEG (Slawecki and Ehlers, 2002).

2 **ÁLCOOL**

Bebidas alcoólicas são amplamente consumidas em todo o mundo. O álcool é a substância psicoativa mais utilizada pela sociedade (Bau, 2002), consumido em grandes doses podendo, além de gerar vício, exercer efeitos prejudiciais em diversos órgãos e sistemas do organismo, como por exemplo, no fígado, sistema cardiovascular, rins e inclusive no sistema nervoso (McGinnis and Foege, 1993). O consumo de álcool é o terceiro maior fator de risco do mundo para doenças e incapacidade, principalmente em países de média renda. O álcool é o fator causal de 60 tipos de doenças e lesões e uma causa componente em 200 outras. Em torno de 4% de todas as mortes no mundo são atribuídas ao álcool, mais do que as mortes causadas por HIV/AIDS, violência ou tuberculose. Também está associado com diversas questões sociais graves, como a violência, negligência infantil e abuso e absentismo no local de trabalho. Aproximadamente 4,5% da carga global de doenças e ferimentos é atribuível ao álcool. Estima-se que o consumo de álcool seja a causa de 20% a 50% dos casos de cirrose hepática, epilepsia, intoxicações, acidentes rodoviários, violência e diversos tipos de câncer. É o terceiro maior risco para a doença e incapacidade, após baixo peso na infância e sexo inseguro. O consumo de álcool contribui para resultados traumáticos, como a morte e incapacitação de pessoas em uma idade relativamente jovem, resultando na perda de muitos anos de vida (WHO, 2011b).

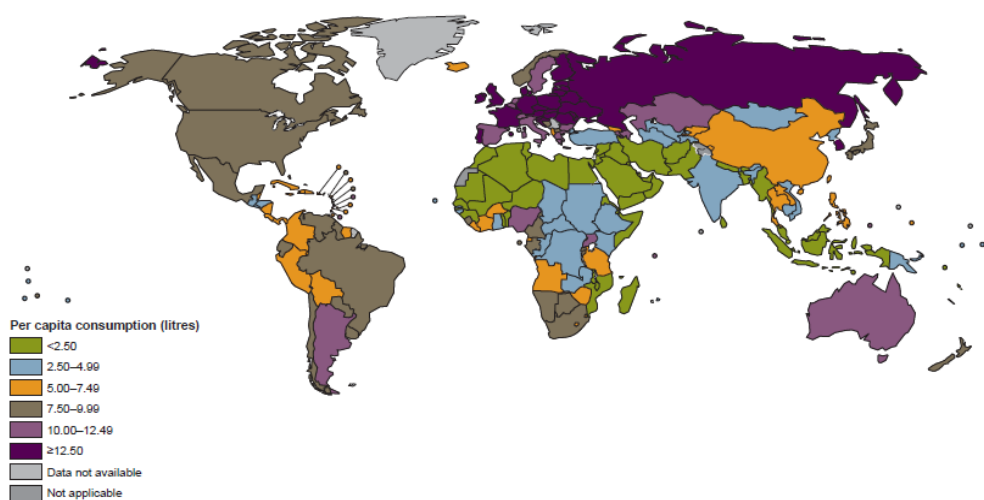
O uso desta droga é uma ameaça particularmente grave para os homens. É o principal fator de risco para morte em homens com idades entre 15-59 anos, principalmente devido a lesões, violência e doenças cardiovasculares. Globalmente, 6,2% de todas as mortes do sexo masculino são atribuíveis ao álcool, em comparação com 1,1% dos óbitos femininos. Os homens também têm taxas muito maiores de carga total, ou seja, quantidade de álcool ingerida em cada episódio, atribuída ao álcool do que as mulheres - 7,4% para os homens contra 1,4% para as mulheres. Os homens também superam as mulheres em episódios semanais de beber pesado - muito provavelmente a razão da sua maior taxa de morte e invalidez. Os homens também têm taxas muito mais baixas de abstinência em comparação com as mulheres. Baixo nível sócio econômico e educacional resultam em maior risco de morte relacionado ao uso do álcool, doenças e injúrias – determinante social que é maior para homens do que mulheres (WHO, 2011b).

O consumo mundial em 2005 foi igual a 6,13 litros de álcool consumido por pessoa com 15 anos ou mais. Uma grande parte desse consumo - 28,6% ou 1,76 litros por pessoa -

era caseiro, ilegalmente produzido ou vendido fora de controle governamental normal (Figura 2).

Consumo per capita mundial de adultos, com 15 anos ou mais, em litros de álcool puro em 2005.

Figura 2. Consumo per capita de álcool (CPA)



Nota: Per capita é a quantidade de álcool consumida em litros de álcool puro em uma dada população. O CPA total consiste no CPA médio de álcool registrado em 2003-2005 e o CPA de álcool não registrado em 2005 (WHO, 2011b).

Segundo a literatura, o consumo de etanol normalmente se inicia durante o período da adolescência e particularmente interessante, é neste período que os indivíduos se tornam consumidores regulares de etanol, ou seja, apresentam consumo maior que uma vez por mês (Courtney e Polich, 2009; Hill et al., 2000). O início precoce do uso de etanol tem sido mostrado em diversos estudos prospectivos e retrospectivos como um poderoso preditor de uso tardio e dependência de etanol (Deykin et al., 1987; Fergusson et al., 1994; Hawkins et al., 1997; Prescott e Kendler, 1999). Além disso, os adolescentes são mais sensíveis a alguns efeitos do etanol quando comparados aos adultos (Slawecki e Roth, 2004; Yttri et al., 2004; Spear e Varlinskaya, 2005). Porém, outros estudos demonstram que adolescentes são mais resistentes a outros efeitos do etanol como, efeito hipnótico (Little et al., 1996; Silveri e Spear, 1998), hipotermia (Silveri e Spear, 2000), perda do controle motor (White et al., 2002), dificuldade em se relacionar com outras pessoas (Varlinskaya e Spear, 2002), alterações no

estado de ansiedade (Varlinskaya e Spear, 2002), analgesia (Hernandez e Spear, 2003) e sedação (Little et al., 1996; Moy et al., 1998; Silveri e Spear, 1998). O uso de etanol durante a adolescência promove danos cognitivos mais severos e maior dano celular cerebral (Spear, 2000; Slotkin, 2002). Desta forma, tem sido proposto que diferentes taxas de desenvolvimento dos sistemas neurais envolvidos em diferentes efeitos do etanol podem contribuir para o mosaico de diferenças de idade em relação à sensibilidade ao etanol (Spear e Varlinskaya, 2005).

Os sintomas dos efeitos de retirada do etanol estão bem estabelecidos tanto em humanos como em modelos animais. Os efeitos do período de retirada são mais severos após exposição crônica e pouco tempo após o início do período de retirada. Estes sintomas incluem: náusea, tremores, hipertermia, taquicardia, irritabilidade, hiperventilação, ansiedade e insônia (Finn e Crabbe, 1997; Roelofs, 1985; Metten e Crabbe, 1996).

A maior parte do etanol é metabolizada pelo fígado em acetaldeído através da enzima álcool desidrogenase, sendo de 2 a 10% apenas eliminado de modo inalterado pela urina, respiração e suor. Em média, na população geral, a álcool desidrogenase diminui a concentração do etanol no sangue em torno de 5 mmol/L de etanol por hora, o que corresponde a um drinque por hora (Schuckit, 2006). O acetaldeído é um composto reativo e tóxico, que promove hepatotoxicidade e também pode contribuir para os efeitos do consumo de etanol sobre o sistema nervoso (Hunt, 1996; Quertemont et al., 2005; Deng e Deitrich, 2008). Quase todo acetaldeído é convertido em acetato no fígado pela enzima aldeído desidrogenase. Os polimorfismos dessas enzimas tem sido estudados como possíveis preditores genéticos para a susceptibilidade do indivíduo apresentar vício pelo etanol (Dickson et al., 2006; Duranceaux et al., 2006). Tão importante quanto, o etanol apresenta como sítios de ação uma grande variedade de alvos nas membranas celulares, como também, cascatas de sinalização intracelulares. Um dos efeitos mais importantes do etanol é sua propriedade de alterar funções dos receptores ionotrópicos (Larsson e Engel, 2004). Esta família de receptores inclui os receptores inibitórios da glicina e GABAA e os receptores excitatórios de NMDA do glutamato, serotonina (5-HT₃), como também, os receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs) (Larsson e Engel, 2004; Lovinger, 1999). A modulação dos nAChRs causada pelo etanol pode levar a uma cascata de eventos sinápticos envolvendo múltiplos neurotransmissores, que resulta em várias mudanças comportamentais. Portanto, o etanol promove alterações funcionais através de interações dose-dependentes em diversos sistemas neurais, incluindo GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e colinérgico (Eckardt et al., 1998). Interessantemente, muitos desses sistemas neurais ainda estão em

maturação durante a adolescência, o que poderia justificar o fato de o cérebro adolescente apresentar grande susceptibilidade aos efeitos do etanol (Carpenter-Hyland e Chandler, 2007; Schepis et al., 2008).

3 O CO-ABUSO

O tabaco e o etanol são as drogas mais comumente usadas no mundo (Dani e Harris, 2005). Estudos epidemiológicos tem relatado que existe uma consistente relação entre o tabagismo e consumo de etanol (Larsson et al., 2004; Miller et al., 1998). Diversas pesquisas tem demonstrado que 80% a 90% dos alcoolistas fumam (Burling e Ziff, 1988). Adicionalmente, o consumo de etanol entre fumantes é duas vezes maior do que entre os não fumantes (Carmody et al., 1985) e estima-se que o alcoolismo seja de 10 a 14 vezes mais comum entre fumantes quando comparados com não fumantes (Di Franza e Guerrera, 1990), além do consumo diário de cigarros por alcoolistas ser maior do que o consumo por fumantes não alcoolistas (Rezvani e Levin, 2002). O uso destas duas drogas normalmente se inicia durante o período de adolescência (Nelson et al., 1995; Spear, 2000). Estudos em adolescentes têm demonstrado uma forte correlação entre a idade de início do tabagismo e a susceptibilidade ao vício pelo etanol (Grant, 1998), caracterizando a adolescência como um período de vulnerabilidade a estas drogas.

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

ambas. Porém, como mencionado em tópico anterior, o tabaco possui mais de 4800 componentes sendo difícil a análise farmacocinética de cada um destes componentes com o etanol. Assim, diversos estudos analisam a presença de uma possível interação farmacocinética de um dos componentes do tabaco, a nicotina que tem sido descrita como sendo um dos componentes ativos da fumaça do cigarro responsável por uma grande variedade de efeitos que resultam do consumo de tabaco (Benowitz, 1992; Dani and Heinemann, 1996), com o etanol. Neste sentido, é de extrema importância conhecer o quanto uma droga pode ter o seu metabolismo afetado pela presença da outra.

O uso de modelos animais de exposição tem sido bastante utilizado para a investigação de substratos biológicos que expliquem a associação entre o fumo e o consumo de álcool. Diversos estudos têm demonstrado que a exposição à nicotina promove aumento da auto-administração de etanol em animais (Larsson e Engel, 2004; Le et al., 2000; Smith et al., 1999). Também tem sido demonstrado que os níveis plasmáticos de etanol, quando este é administrado via oral, são reduzidos em animais expostos concomitantemente a nicotina (Chen e Harle, 2005; Gilbertson e Barron, 2005). Porém, quando a forma de administração do etanol é realizada intraperitonealmente (i.p.), a concentração plasmática de etanol não é afetada pela exposição à nicotina (Parnell et al., 2006). Corroborando este achado, em 1988, Collins e colaboradores demonstraram que a exposição à nicotina não afeta a taxa de eliminação de etanol. Apesar de o mecanismo que explica a habilidade da nicotina em reduzir a concentração sanguínea de etanol quando este é administrado oralmente, ainda não ser completamente elucidado, a literatura sugere que a nicotina promove redução do esvaziamento gástrico (Nowak et al., 1987; Scott et al., 1993), possivelmente por induzir relaxamento da musculatura gástrica (Tugay et al., 2003). Desta maneira, o álcool fica retido no estômago por um tempo maior, sendo sujeito à ação da enzima álcool desidrogenase presente no estômago. Como a maioria da absorção do etanol é realizada pelo intestino delgado (Johnson et al., 1991), haveria uma redução da absorção do etanol e, conseqüentemente, uma menor concentração plasmática. Além disso, estudos apontam que nicotina e etanol compartilham importantes mecanismos neuroquímicos de ação nos sistemas de recompensa cerebrais que podem ser afetados pelo consumo de nicotina durante a adolescência, o que pode tornar o indivíduo mais inclinado a desenvolver um abuso futuro de álcool e/ou outras drogas (Blomqvist et al., 1996; Smith et al., 1999). Corroborando esta hipótese, a exposição à nicotina em ratos durante um curto período de tempo durante a adolescência apresenta como resultado um aumento de consumo de álcool na idade adulta (Tsui et al., 2001).

Estudos epidemiológicos sugerem que as interações entre nicotina e o etanol podem acontecer durante o período de retirada das drogas. Por exemplo, a interrupção do ato de fumar é mais difícil de realizar por indivíduos que abusavam ou abusam do etanol (Bobo et al., 1987). Além disso, a interrupção do tabagismo tem sido associada com a alteração do consumo de etanol, podendo aumentar esse consumo (Carmelli et al., 1993) ou diminuí-lo (Friend e Pagano, 2005). Alguns trabalhos têm sugerido que o uso de nicotina pode diminuir os sintomas da abstinência pelo etanol (Lallemant et al., 2007).

Tem sido proposto que os receptores nicotínicos $\alpha 2$ contribuem para a geração dos distúrbios afetivos gerados pela retirada da nicotina (Jackson et al., 2008), como também, os receptores nicotínicos $\alpha 4$ parecem modular os efeitos da abstinência pelo etanol (Butt et al., 2004). Uma vez que a nicotina é um análogo da acetilcolina, seus alvos primários e mediadores celulares são os nAChRs, receptores ionotróficos amplamente distribuídos no sistema nervoso. O etanol por sua vez, tem influência direta na função de vários canais iônicos ativados por neurotransmissores, incluindo os nAChRs (Grant, 1994). Além disso, tem sido demonstrado que o aumento da liberação de dopamina no núcleo accumbens pelo álcool parece requerer ativação de receptores nicotínicos na área do tegumento ventral (Harris, 1999). Em conjunto, estes dados sugerem que o sistema colinérgico pode ser um sítio de interação entre nicotina e etanol. De acordo com esta hipótese, estudos realizados com camundongos em nosso laboratório demonstraram existir interação entre essas drogas na ansiedade e no aprendizado/memória, comportamentos estes associados com a função do sistema colinérgico (Abreu-Villaça et al., 2007; 2008). Junto disto, o sistema mesolímbico dopaminérgico, associado com sensações de prazer, é de grande importância para ação de drogas de abuso. Embora os mecanismos exatos da ação de drogas de abuso no sistema mesolímbico dopaminérgico não estejam estabelecidos, acredita-se que estas drogas, atuando direta ou indiretamente em células dopaminérgicas, causem alterações persistentes, as quais seriam responsáveis, pelo menos em parte, pelas reações adversas associadas à abstinência (Blomqvist et al., 1992).

4 ADOLESCÊNCIA

Como mencionado acima, tem sido sugerido que adolescentes são particularmente sensíveis aos efeitos do tabaco. Uma razão para preocupação é o fato de que o uso de tabaco por adolescentes está aumentando em todo o mundo (WHO 1997). A maioria dos fumantes inicia o hábito na adolescência ou pré-adolescência (Nelson et al., 1995; Pierce and Gilpin 1996), fazendo com que a dependência ao tabaco seja frequentemente considerada uma “doença pediátrica” (Prokhorov et al., 2006). Estudos descrevem que mais de um terço dos estudantes adolescentes fumam (Centers for Disease Control and Prevention 1998, 2000). No mundo inteiro, entre 82.000 e 99.000 jovens começam a fumar diariamente e 4 milhões de mortes a cada ano estão relacionadas ao uso dessa droga de abuso (Prokhorov et al, 2006, Abreu-Vilhaça et al., 2010). No Brasil, o Ministério da Saúde lançou no ano passado a campanha "Viver bem é viver com saúde. Fique longe do cigarro". A ação celebra o Dia Nacional de Combate ao Fumo. Durante o evento realizado no Rio de Janeiro, foi lançada uma pesquisa a qual aponta que os adolescentes brasileiros não têm dificuldade para comprar cigarro, apesar de o país dispor da Lei Federal (n.º 8.069/1990) que proíbe a venda do produto para menores de idade. O percentual de meninas entre 13 e 15 anos que já comprou cigarro chega a 52,6% e a 48,1% entre meninos em algumas capitais do país (Ministério da saúde, 2011).

Começar a fumar durante a adolescência está associado à dependência química que se estende por longos períodos (Chen and Millar, 1998; National Institute on Drug Abuse, 1998; Nelson et al., 1995) e talvez mais importante, parte dos fumantes adolescentes apresentam sintomas de dependência antes mesmo de se tornarem fumantes diários, frequentemente somente com poucos dias de fumo ocasional (Di Franza et al., 2000, 2002a, 2002b; O'Loughlin et al., 2002). Isto sugere que o cérebro do adolescente é mais susceptível a dependência ao tabaco, em particular a substância nicotina, o que está de acordo com estudos que indicam que respostas a substâncias psicoativas são intrinsecamente diferentes durante este período do desenvolvimento (Leslie et al., 2004; Spear, 2000; Spear and Brake, 1983). Desta forma, adolescentes apresentam grande probabilidade de experimentar drogas de abuso, incluindo tabaco e etanol (Grant et al., 1987; Nelson et al., 1995; Webster et al., 1994), e desenvolver vício quando comparados a indivíduos adultos (Maggs et al., 2008). Ao lado disto, parece existir uma forte correlação entre a idade inicial do uso da droga e a probabilidade de apresentar vício quando adulto (Di Franza e Guerrero, 1990), como também, o uso de uma droga na adolescência parece estimular o uso de diversas drogas de abuso

durante o transcurso da vida (Kandel et al., 1992). Para múltiplas drogas de abuso, como o tabaco e o etanol, indivíduos que não iniciaram o uso durante a adolescência dificilmente iniciam o uso em idades posteriores (Chen e Kandel, 1995; Kandel e Logan, 1984).

Em relação ao consumo de álcool, perigosos e nocivos padrões de consumo, tais como beber até se embriagar e consumo excessivo de álcool, parecem estar em alta entre os adolescentes e jovens adultos (WHO, 2007; McAllister, 2003; Lancet, 2008). Uma razão pode ser o uso de bebidas alcoólicas conhecidas como "Alcopops", que provocam padrões de consumo mais problemáticos, tais como beber mais freqüentes, início mais precoce do consumo de álcool e a embriaguez (Kraus et al., 2010). "Alcopop" é um termo coloquial que descreve bebidas alcoólicas com sabor, ou seja, bebidas de malte, vinho ou que contenham álcool destilado com ingredientes adicionados como suco de frutas ou outros aromas diversos. O termo "Alcopop", junção das palavras álcool e pop, é utilizado pelos defensores de restrições mais rígidas para vendas de bebidas alcoólicas, que argumentam que as bebidas são especialmente atraentes para os bebedores menores de idade (definição Wikipedia). Adicionalmente, o contato inicial com etanol durante a adolescência pode aumentar a probabilidade de consumo durante a idade adulta, tornar mais difícil abandonar o vício, além de aumentar a probabilidade de recaídas durante a abstinência. Além disso, para estes indivíduos, o contato com etanol durante a adolescência pode ter um impacto significativo nos sistemas neurais envolvidos nos mecanismos de recompensa em relação ao etanol (Barron et al., 2005), como ativação do sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (Larsson e Engel, 2004).

Na Europa, estudos foram realizados em uma tentativa de coletar dados comparáveis sobre o consumo de álcool entre os jovens. Conhecido como ESPAD, o Projeto Europeu de Inquéritos Escolares sobre o Álcool e outras Drogas, foi realizado pela primeira vez em 1995 e fornece uma visão fiável das tendências no uso de drogas lícitas e ilícitas entre os estudantes europeus (15-16 anos) entre 1995 e 2007, bem como um quadro abrangente da utilização pelos jovens de álcool na Europa. Neste estudo, as diferenças de gênero não foram encontradas na freqüência de embriaguez ao passo que o consumo episódico pesado foi mais comum entre jovens do sexo masculino (Hibell et al., 2009).

O sistema nervoso em desenvolvimento é mais vulnerável a danos que o sistema nervoso do adulto. Estima-se que cerca de 12 milhões de crianças apresentem problemas de aprendizado, do desenvolvimento do sistema nervoso ou alterações comportamentais somente nos EUA, sendo que os custos com tratamentos devido à exposição a agentes ambientais é superior a 50 bilhões de dólares (Landrigan et al., 2002). O período de formação do cérebro é

mais longo que o de outros órgãos. O desenvolvimento do cérebro continua até a adolescência, quando ainda ocorre proliferação de neurônios, apoptose e rearranjo sináptico (Altman and Bayer, 1990; Bayer 1983; Bayer et al., 1982; Huttenlocher, 1990; McWilliams and Lynch, 1983). Mais especificamente, a maturação dos sistemas colinérgicos do sistema nervoso central envolvidos em memória, aprendizado e respostas a psicoestimulantes, é consolidada durante o período da periadolescência (Leslie et al., 2004; Matthews et al., 1974; Nadler et al., 1974; Zahalka et al., 1993), sendo um importante aspecto deste período o fato da estimulação neuronal induzir rearranjo sináptico (Scheetz and Constantine-Paton, 1994), o que sugere que o cérebro do adolescente particularmente vulnerável a estimulantes do sistema nervoso central. De particular interesse para o presente estudo, a maturação do sistema colinérgico central, envolvido com o aprendizado/memória e repostas a psicoestimulantes, é consolidada durante o período da periadolescência (Matthews et al., 1974; Nadler et al., 1974; Zahalka et al., 1993). Regiões neurais como o córtex pré-frontal e outras regiões de projeções dopaminérgicas do prosenencéfalo, apresentam alterações proeminentes durante a adolescência. Dada a importância dessas regiões cerebrais na modulação de mecanismos de recompensa associados ao uso de drogas (Koob, 1992) e de respostas a agentes estressores (Dunn e Kramarcy, 1984) e a associação entre ambos (Goeders, 1997; Piazza et al., 1991), não é espantoso constatar que adolescentes respondem de formas diferentes a drogas de abuso, agentes estressores e a interação entre ambos, quando comparados com animais adultos ou mais maduros (Spear, 2002). Assim, adolescentes apresentam grande probabilidade de experimentar drogas de abuso, incluindo tabaco e etanol (Grant et al., 1987; Nelson et al., 1995; Webster et al., 1994), e desenvolver vício quando comparados a indivíduos adultos (Maggs et al., 2008).

5 EXPOSIÇÃO COMBINADA À NICOTINA E ETANOL

A exposição combinada a nicotina e ao etanol afeta memória e aprendizado, níveis de ansiedade e o sistema colinérgico central de forma diferenciada dos efeitos da exposição isolada à nicotina ou ao etanol, o que indica que estas drogas interagem, afetando o funcionamento do sistema nervoso central durante este período do desenvolvimento. Outros estudos em modelos animais de exposição à nicotina também tem mostrado que esta induz seus efeitos farmacológicos centrais atuando em receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs), os quais estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central, principalmente na membrana pré-sináptica e atuam como receptores ionotrópicos que promovem liberação de neurotransmissores (Wonnacott, 1997). Assim, a ativação de nAChRs tem papel neuromodulador no SNC e está envolvido em um grande número de processos fisiológicos e patológicos como a neurotransmissão da dor, controle de movimentos, processos cognitivos, respostas emocionais, e efeitos de drogas de abuso (Buisson and Bertrand, 2002; File et al., 2002; Jain, 2004; Katner et al., 2004; Schochet et al., 2004). Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa onde era utilizado um modelo de exposição concomitante a etanol e a nicotina na adolescência de camundongos, encontramos que o etanol promove diminuição da ansiedade na adolescência desses animais e que a nicotina pode reverter este efeito. Para esta análise, utilizamos o teste do labirinto em cruz elevado, teste utilizado na avaliação dos níveis de ansiedade. Além disso, este estudo indicou que o etanol e a nicotina podem interagir após longo tempo de retirada na idade adulta, promovendo aumento da ansiedade (Abreu-Villaça et al., 2008). Também observamos interação entre as drogas na memória/aprendizado através do teste da esQUIVA passiva, teste amplamente utilizado para se avaliar este comportamento. Demonstramos que a nicotina e o etanol quando expostos concomitantemente promovem danos na memória significativamente maiores do que quando cada droga é administrada isoladamente também em camundongos adolescentes (Abreu-Villaça et al., 2007). Neste mesmo estudo, também se verificou que após pequeno tempo de retirada, a nicotina promoveu melhora na memória/aprendizado, mas que este efeito foi bloqueado pelo uso concomitante do etanol. Tsukada et al., (2005) mostraram que a administração crônica de nicotina aumenta a liberação de dopamina no córtex pré-frontal de macacos rhesus adultos e promovem uma pior performance em um tipo de memória, a operacional. Estudo realizado em ratos adolescentes expostos ao etanol demonstrou que o mesmo causa danos à memória durante a exposição e a retirada no teste do labirinto aquático de Morris (Sircar e Sircar, 2005; White, 2005), enquanto que a memória não parece ser afetada durante o período de retirada no teste

da esquivia passiva (Popovic et al., 2004). Além disso, enquanto o etanol impede a atenção sustentada e a memória recente durante sua exposição e retirada em ratos (Çelik et al., 2005; Givens, 1997; Givens e McMahon, 1997), bem como a capacidade de atenção em humanos (Koelega, 1995; Parsons e Nixon, 1998), a co-administração de nicotina mostrou uma ação preventiva aos efeitos do etanol em animais experimentais (Tracy et al., 1999). Em relação à neurotoxocidade, foi observado que o etanol promove aumento da morte celular em todas as áreas do hipocampo de camundongos adolescentes, sendo ambas as populações de neurônios e glia afetados, enquanto que a nicotina causou aumento seletivo da morte celular, sendo as camadas molecular e CA1 afetadas. Neste estudo também houve interação de efeitos quando as duas drogas foram expostas simultaneamente, só que neste caso, a exposição combinada promoveu efeitos menos severos na morte celular (Oliveira-da-Silva et al., 2009).

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

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

da atividade. Já alguns dias do término da exposição, animais que receberam somente nicotina apresentaram aumento na atividade que foi revertido na retirada combinada das drogas. Um mês após o término da exposição, animais expostos a nicotina e etanol apresentaram redução da atividade. Em relação à captação de colina, não houve alterações ao final da exposição. Animais que receberam etanol e animais que receberam as duas drogas juntas apresentaram redução da marcação alguns dias após a retirada das drogas, a qual persistiu até um mês após o término da exposição (Ribeiro-Carvalho et al., 2009).

Devido ao grande número de componentes presentes na fumaça do cigarro, pode-se levantar a hipótese que outros componentes além da nicotina tenham papel relevante nos efeitos do tabaco no sistema nervoso central. Contudo, o grande número de componentes presentes na fumaça de cigarro e poucos dados sobre seus efeitos psicoativos têm dificultado progressos nesta área. Apesar de vários estudos atribuírem os efeitos deletérios do tabaco à nicotina, há carência de estudos que investiguem os efeitos da exposição à nicotina em combinação com os demais componentes da fumaça de cigarro. Da mesma forma, apesar de termos demonstrado que a nicotina interage com o etanol durante a adolescência de camundongos, não sabemos se a exposição à fumaça de cigarro – a qual contém nicotina como um dos seus componentes – interage com o etanol de forma semelhante à exposição à nicotina isoladamente. Esta questão é particularmente relevante uma vez que adolescentes que fumam e consomem bebidas alcoólicas são expostos a várias outras substâncias presentes na fumaça do cigarro, as quais tem o potencial de interagir com o etanol.

6 OBJETIVOS

6.1 Gerais

- ❖ Investigar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro e/ou ao etanol durante a adolescência na memória/aprendizado de camundongos.
- ❖ Identificar efeitos da exposição à fumaça de cigarro e/ou ao etanol durante a adolescência no sistema colinérgico central.

6.2 Específicos

- ❖ Verificar alterações na memória/aprendizado ao final o período de exposição à fumaça de cigarro, ao etanol e à dupla exposição tabaco+etanol;
- ❖ Verificar se as alterações comportamentais persistem no período de retirada das drogas até a idade adulta;
- ❖ Verificar alterações no sistema colinérgico central hipocampal ao final o período de exposição à fumaça de cigarro, ao etanol e à dupla exposição tabaco+etanol;
- ❖ Verificar se as alterações colinérgicas hipocampais persistem no período de retirada das drogas até a idade adulta;

7 MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um projeto de dissertação de natureza experimental sendo integralmente desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Todos os experimentos descritos aqui foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG / UERJ (CEUA/014/2011) e estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelo Instituto Nacional de Saúde (National Institutes of Health - NIH) dos Estados Unidos da América.

7.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados 314 animais da cepa *Swiss* (157 machos e 157 fêmeas) oriundos de 33 ninhadas. Estes animais foram criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro em fotoperíodo de 12h com temperatura controlada e mantida em torno de 25°C, com livre acesso à água e comida.

No primeiro dia pós-natal (PN1), certificamo-nos de que em cada ninhada havia um número de filhotes entre oito e doze. Caso houvesse um número superior a doze ou menor que oito filhotes, estas ninhadas não eram utilizadas. Ao completarem 21 dias de vida pós-natal (PN21), os animais eram desmamados e agrupados por sexo, em um máximo de cinco animais por gaiola e a progenitora era sacrificada. Após o desmame, em PN29, os animais de no mínimo duas ninhadas eram agrupados e divididos por sexo, grupo experimental e idade para administração das drogas de abuso e realização dos testes comportamentais, descrito em detalhes abaixo. Em PN30 era iniciado o tratamento com as drogas de abuso. Os animais eram pesados diariamente durante o período de exposição.

7.2 Exposição as drogas

7.2.1 Exposição à fumaça de cigarro

Visando simular consumo diário de tabaco, camundongos adolescentes foram expostos à fumaça de cigarros (Figura 3) por 8 horas/dia do 30^o ao 45^o dia de vida pós-natal (PN30-PN45). Em roedores, o período de PN30 a PN45 corresponde à idade aproximada durante a qual animais de ambos os sexos exibem características comportamentais típicas e fenômenos neuroquímicos e endócrinos particulares da adolescência (Spear, 2000).

O fumo passivo é resultante da exposição à combinação da fumaça liberada pela extremidade do cigarro durante a queima (*sidestream*) e da fumaça expirada pelo fumante ativo, ou seja, a fumaça que passou pelo filtro do cigarro (*mainstream*) e pelas vias aéreas/pulmão do indivíduo. Nos pulmões, a fumaça tem sua composição alterada, principalmente pela remoção de nicotina, monóxido de carbono (CO) e substâncias particuladas. Quanto à fumaça *sidestream*, esta é gerada à baixas temperaturas de queima e tem composição química diferente da fumaça *mainstream* (Witschi et al., 1997). É importante salientar que fumantes ativos são expostos a uma combinação entre fumaça *mainstream* e fumo passivo. Em nosso modelo de exposição, visando nos aproximarmos deste padrão de exposição, a fumaça *sidestream* foi reforçada com fumaça *mainstream* sendo utilizada como substituta da exposição ao tabaco (Slotkin et al., 2001). Desta forma, utilizamos uma mistura de 89% de fumaça *sidestream* e 11% de fumaça *mainstream* (Slotkin et al., 2001) geradas a partir de uma máquina de fumaça de cigarro (Teague Enterprises, Davis, CA) mostrada na Figura 1. Para a formação desta fumaça, foram usados cigarros para pesquisa do tipo 3R4F (Tabela 3) (Kentucky University, Louisville, KY, USA). Este cigarro apresenta valores próximos aos cigarros industrializados (Tabela 2).

Figura 3. Máquina de fumaça de cigarro



Legenda: O cigarro é empurrado pelo pistão, entrando em contato com a resistência que provoca seu acendimento. A fumaça formada é direcionada para a câmara de mistura e desta, por tubos dispostos na parte posterior da máquina (não mostrados nesta figura) para as câmaras de exposição, nas quais os animais se encontram.

Fonte: Teague Enterprises, Davis, CA

Tabela 3. Características do cigarro para pesquisa do tipo 3R4F. Cig: cigarro

CARACTERÍSTICAS DO CIGARRO PARA PESQUISA DO TIPO 3R4F	
Partículas totais em suspensão (PTS)	11,0 mg/cig
Alcatrão	9,4 mg/cig
Nicotina	0,73 mg/cig
Monóxido de Carbono (CO)	12,0 mg/cig

Tabela 4. Concentração de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono (CO) em cigarros industrializados. Cig = cigarro

Cigarros	Alcatrão	Nicotina	CO
MALBORO(vermelho)	10 mg/cig	0,8 mg/cig	10 mg/cig
L&M (azul)	7 mg/cig	0,6 mg/cig	9 mg/cig
Derby (azul)	8 mg/cig	0,7 mg/cig	9 mg/cig

Durante todos os dias de tratamento os animais eram transportados, diariamente, a uma sala contendo a máquina da fumaça de cigarro e colocados em uma câmara onde era realizada a exposição. Os animais do grupo veículo (VEH), que foram expostos a ar, eram colocados na mesma sala, porém, em câmaras similares a que era feita a exposição à fumaça, e expostos a ar.

7.2.2 Exposição ao etanol

Visando nos aproximarmos de um padrão intermitente de consumo, administramos uma dose moderada de etanol em dias alternados para melhor simular o consumo cíclico do álcool feito por adolescentes (Tokunaga et al., 2006; White et al., 2000). Essa administração ocorreu durante o período de adolescência dos animais do 30º ao 45º dia de vida pós-natal (PN30-PN45) sendo a 1ª administração em PN30 e a última em PN44, devido a administração ocorrer em dias alternados. O etanol era diluído em salina para uma concentração final de 25% (v/v) (2g de etanol/Kg de peso do animal) e administrado através de injeções intraperitoneais.

7.2.3 Formação dos grupos experimentais

Desta forma, para o estudo completo do impacto da exposição à fumaça de cigarro e ao etanol analisamos quatro grupos experimentais:

1. **FUM+ETAN** (fumaça de cigarro+ etanol i.p). Animais expostos à fumaça gerada a partir da queima de cigarros para pesquisa tipo 3R4F em máquina de fumaça de cigarro e que receberam uma injeção i.p. de álcool etílico (2g/kg, 25%, v/v) em dias alternados.
2. **FUM** (fumaça de cigarro + salina i.p). Animais que receberam salina i.p., ao invés de injeção de álcool etílico e exposição à fumaça gerada a partir da queima de cigarros.
3. **ETAN** (exposição a ar + etanol i.p). Animais que receberam etanol i.p. e exposição a ar em uma câmara semelhante à câmara de exposição à fumaça.
4. **VEH** (exposição a ar + salina i.p).

Os animais de cada ninhada foram designados aleatoriamente para os diferentes grupos de exposição e idades dos testes comportamentais conforme mostra o Quadro 1 a seguir.

Quadro 1 – Distribuição de camundongos por tratamento, sexo e idade.

TRATAMENTO	PN45		PN50		PN75		TOTAL
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	
FUM+ETAN	9	12	9	12	13	13	68
FUM	12	12	15	14	12	12	77
ETAN	8	12	11	11	12	13	67
VEH	12	9	14	12	12	12	71
Total	41	45	49	49	49	50	283

Nota: Neste quadro não estão incluídos os animais utilizados para quantificação de cotinina e etanol plasmáticos.

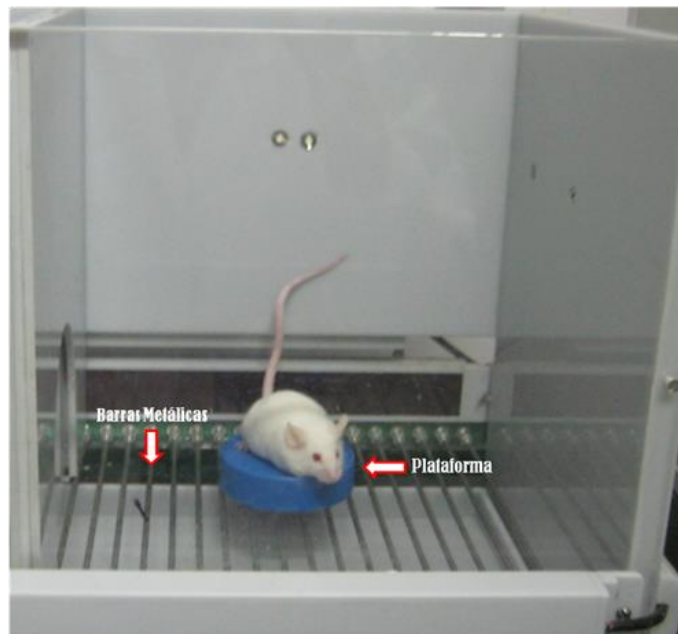
7.3 Teste comportamental

Os animais foram submetidos a análise comportamental ao final do período de exposição (PN44 e PN45), durante o período de retirada de curto prazo (PN49 e PN50) ou durante o período de retirada de longo prazo (PN74 e PN75). A fim de diminuir situações de estresse que pudessem interferir no resultado do experimento, o horário para a realização do teste comportamental, bem como o local de realização destes, foram os mesmos utilizados em as idades estudadas e os animais eram ambientados na sala de testes por dez minutos antes de iniciada a análise comportamental. Os animais testados ao final do período de exposição (PN44 e PN45) eram expostos por três horas, retirados da câmara de exposição e ambientados por 10 min como descrito acima, antes dos testes comportamentais.

Para identificar possíveis efeitos do tabaco, etanol e da dupla exposição na memória e aprendizado, os animais foram submetidos ao Teste de Esquiva Passiva (Figura 6). O mesmo foi realizado em uma caixa (25cm x 25cm) com uma plataforma circular com diâmetro de 6,5cm e altura de 1,7cm, posicionada centralmente sobre uma grade metálica com espaçamento igual entre as barras. Os animais foram submetidos a três sessões experimentais (0 horas, 3 horas depois da primeira sessão (T3) e 24 horas depois da primeira sessão (T24)). No primeiro dia de teste, durante a primeira sessão (0 horas), os animais foram individualmente colocados sobre a plataforma e esperou-se até três minutos para que descessem. Ao descer, imediatamente após colocarem as quatro patas na grade metálica,

recebiam um choque de 0,3 mA durante 3 segundos. Três horas (T3) e vinte quatro horas (T24) após a primeira sessão, os animais foram testados novamente, porém, sem administração de choque. O tempo que os animais levam para descer da plataforma (latência) foi anotado durante as três sessões experimentais. O componente de memória e aprendizado da tarefa de esquiwa passiva é expresso por um aumento na latência para a descida da plataforma após o teste inicial. Portanto, de modo a visualizar mais claramente as diferenças entre os grupos, o componente de memória e aprendizado da tarefa foi avaliado calculando os seguintes índices: $(T3-T0)/T0$ e $(T24-T0)/T0$.

Figura 4. Teste da Esquiwa Passiva



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

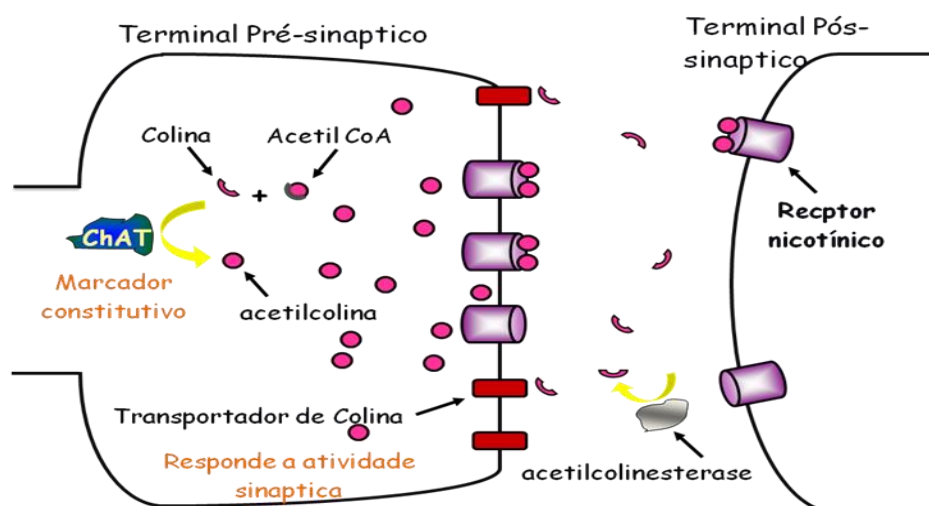
7.4 Análise neuroquímica

7.4.1 Preparação do tecido

As análises bioquímicas foram realizadas com o tecido cerebral dos animais submetidos ao teste da esQUIVA passiva, os quais foram sacrificados ao final do período de exposição, em PN45, e em mais dois momentos durante o período de retirada (PN50 e PN75). Os cérebros foram dissecados sendo os hipocampos separados e congelados rapidamente por imersão em nitrogênio líquido e, então, guardados a -45°C para a posterior análise.

Sabendo que a nicotina é um agonista colinérgico, tivemos como foco de estudo o sistema colinérgico. Esse sistema foi estudado no hipocampo uma vez que esta região está envolvida em funções cognitivas, como os processos de memória e aprendizado. Dessa forma, analisamos a atividade da colina acetiltransferase (ChAT) e a ligação do $[3\text{H}]$ hemicolinio-3 (HC-3) ao transportador pré-sináptico de colina. A ChAT, responsável pela biossíntese da acetilcolina, é um marcador constitutivo de terminais colinérgicos; sendo sua atividade utilizada como indicador da integridade dos terminais colinérgicos. Em contraste, a ligação do HC-3 ao transportador de colina é responsiva a atividade neuronal, de forma que comparações entre efeitos na atividade da ChAT e HC-3 nos permitem distinguir entre efeitos na densidade de terminais e mudanças na atividade sináptica (Aubert et al., 1996). Por último, também avaliamos a atividade da enzima acetilcolinesterase, responsável pela degradação da acetilcolina na fenda sináptica (Figura 4).

Figura 5. Esquema ilustrativo dos marcadores da atividade colinérgica



No dia das análises, os tecidos estudados foram descongelados e homogeneizados (Polytron; IKA, Staufen, Alemanha) em 40 volumes de tampão Tris HCl 50mM (pH 7,4) a 4°C. Alíquotas de tecido deste preparado foram separadas para a verificação da atividade das enzimas Colina Acetiltransferase (ChAT) e Acetilcolinesterase (AChE) e também para a quantificação de proteína total tecidual.

Para preparar a fração de membrana celular, 0,96ml do tecido homogeneizado foi sedimentado a 40.000g por 10min e a solução sobrenadante descartada. O pellet foi ressuspenso (Polytron) no volume original do tampão e submetido à nova centrifugação (também a 40.000g por 10min), ressuspenso em um quarto do volume do tampão, 0,24ml, sendo homogeneizado novamente com pistilo de teflon. Alíquotas desta ressusensão foram utilizadas para a quantificação do transportador pré-sináptico de colina de alta afinidade utilizando o ligante [3H]hemicolinio-3 ([3H]HC-3) e para quantificação de proteína de membrana.

Para evitar qualquer efeito que poderia ser gerado por variações nos ensaios realizados em diferentes dias, para cada dia de experimento foi processado o mesmo número de amostras de cada grupo experimental. Ou seja, cada grupo de animais a ser analisado teve o mesmo número de representantes em todas as sessões experimentais.

Atividade da ChAT (Abreu-Villaça et al., 2003, 2004; Ribeiro-Carvalho et al., 2009; Nunes-Freitas AL et al., 2011): Amostras contendo 44µl do tecido homogeneizado foram diluídas em um volume total de 110µl de tampão fosfato de diluição (pH=7,4). Também foram realizados “brancos”, onde era adicionado tampão de homogenização ao invés da alíquota de tecido homogeneizado. Para cada amostra de tecido, o procedimento foi realizado em triplicata. A cada triplicata contendo 30µl do tecido homogeneizado foi adicionado 30µl de MIX (12,6µl de tampão fosfato de sódio a 0,36M (pH 7,9) + 10µl de NaCl a 1,2M + 1µl de MgCl₂ a 0,99M + 1µ de EDTA a 60mM + 1µl de colina a 1,2M + 1µl de Triton X-100 a 12% v:v + 1µl de fisostigmina a 7,2mM + 1µl de albumina de soro bovino a 36mg/ml e 1,2µl de [14C]acetil-coenzima A. Cada triplicata foi pré-incubada em gelo por 15min, sendo depois transferida para “banho-maria” a 37°C (temperatura necessária para a formação da acetilcolina marcada a partir da [14C]acetil-coenzima A) por 30 min. A fração contendo a acetilcolina marcada foi extraída por centrifugação. O sobrenadante foi pipetado em potes plásticos com 5ml de líquido cintilográfico. A quantificação da radioatividade foi avaliada por espectrometria de cintilação líquida, sendo a atividade da enzima corrigida pela quantidade total de proteína presente no tecido.

7.4.2 Atividade da AChE

Foi medida através do modo espectrofotométrico descrito por Ellman (Ellman et al., 1961). Em uma cubeta de 1ml, foram adicionados 0,1 ml do homogenato diluído em um volume total de 1,2 ml com concentração final de 97 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,6), 1 mM de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzólico) (DTNB) e 1,1 mM de acetilcolina (*acetylthiocholine iodide*). Imediatamente após a adição de tecido, a solução foi lida em 412 nm, em modo cinético a cada 30 segundos durante 2 minutos. A absorbância do branco foi subtraída dos valores finais de leitura. Para obtenção dos valores de atividade da acetilcolinesterase em nmoles de produto formado por unidade de tempo, realizou-se uma correlação com uma curva padrão de L-cisteína, previamente construída. A curva padrão de L-cisteína (dados não apresentados) foi construída a partir da utilização de diferentes concentrações do aminoácido L-cisteína, o qual reage diretamente com o DTNB sem que seja necessária a hidrólise da molécula ou qualquer reação enzimática. A atividade da enzima foi determinada em relação à proteína do tecido.

7.4.3 Transporte pré-sináptico de colina

Para as medidas de marcação por [3H]HC-3, três alíquotas do preparado de membrana foram incubadas por 10 min à temperatura de 20°C em tampão fosfato (pH 7,4) e 150mM de NaCl, com a adição de 2nM de [3H]HC-3 em um volume final de 0,5ml. Para avaliar a marcação inespecífica, uma das alíquotas utilizadas também era incubada na presença de uma concentração excedente de 10mM de HC-3 não marcado para deslocar o sítio específico de marcação. Após o período de incubação, 3ml de tampão foi adicionado para a realização da filtração através do *Cell Harvester* (Brandel, Gaithersburg, Maryland, EUA), sendo seguido por 3 lavagens do preparado de membrana marcado com 4ml de tampão. Os filtros foram previamente tratados com tampão contendo 0,1% de polietilenamina por 30min. As porções de filtro referentes a cada amostra eram coletadas e guardadas em potes plásticos com 5ml de líquido cintilográfico por 12h. A quantificação da radioatividade foi avaliada por espectrometria de cintilação líquida. A marcação específica para o transportador de colina foi calculada pela diferença entre a marcação total da amostra e a marcação inespecífica

encontrada. Os valores para esta marcação foram corrigidos pela quantidade de proteína de membrana (marcação específica por mg de proteína de membrana).

Cabe mencionar que a seleção de apenas uma concentração de radioligante permite a detecção na mudança de marcação, mas não possibilita estabelecer se este fato se dá por mudança na afinidade do ligante ao transportador (K_d) ou na sua quantidade (B_{max}). Muitas concentrações de radioligante necessariamente envolveriam um maior número de ensaios, tornando necessário um maior volume tecidual. Como o volume tecidual obtido para as áreas estudadas foi pequeno, seria necessário processar na mesma amostra tecidos de animais diferentes de um mesmo grupo experimental (pool de tecido), aumentando, assim, o número total de animais utilizados no estudo. Além deste fato, para manter o padrão ideal de cada dia experimental, com o processamento tecidual possuindo representantes de todos os grupos, a utilização de várias doses de radioligante tornaria necessário o processamento de um grande número de amostras em um mesmo dia de experimento, tornando-o inviável do ponto de vista técnico.

7.4.4 Quantificação da proteína tecidual total e proteína de membrana

A avaliação da quantidade de proteína total (para a correção da marcação da ChAT e da AChE) e da proteína de membrana (para a correção da marcação do HC-3) foi realizada através do kit *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA). O princípio do BCA se baseia na formação do complexo Cu^{2+} -proteína em condições alcalinas, seguida da redução de Cu^{2+} para Cu^{+1} . A quantidade de redução é proporcional à quantidade de proteína presente, sendo gerado um gradiente colorimétrico (verde-roxo). A leitura colorimétrica das amostras foi medida utilizando o aparelho de ELISA usando um filtro de 512nm.

7.5 **Cotina e etanol em soro**

Visando avaliar o grau de exposição e identificar possíveis interações farmacocinéticas entre tabaco e etanol, quantificamos cotinina em soro, principal metabólito da nicotina, por EIA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* -(OraSure Technologies, Inc., Bethlehem, PA, USA) e etanol em soro por ensaio enzimático (Point Scientific, Canton, MI, USA). Os animais expostos à fumaça de cigarro e/ou etanol, ao final do período de exposição (PN44), eram sacrificados após exposição durante três horas na máquina de fumaça do cigarro. Todos

os animais foram decapitados e o sangue coletado para realização da análise citada anteriormente. O sangue dos animais foi centrifugado à 2000g por 20min e o sobrenadante (soro) utilizado para os ensaios.

Em relação á quantificação da cotinina em soro, foram utilizados 16 animais (Tabela 5). Estes animais não foram submetidos ao teste da esQUIVA passiva e os cérebros não foram utilizados para avaliação do sistema colinérgico.

Tabela 5. Animais utilizados para a quantificação de cotinina plasmática.

	VEH	ETAN	FUM	FUM+ETAN
Machos	2	2	3	3
Fêmeas	2	-	2	2
TOTAL	4	2	5	5

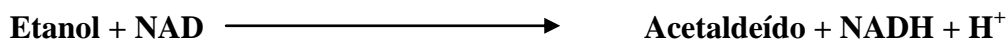
Em uma placa contendo 96 poços foram pipetados 10µl de soro e incubados por 30min com 100µl de conjugado enzimático (cotinina marcada com peroxidase de raiz forte diluída em uma matriz de proteínas com estabilizantes), em condições isentas de iluminação a temperatura de 15° a 27°C. A placa foi então lavada 5x com 300µl de água destilada e incubada novamente 30min com 100µl de substrato reagente (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina), em condições idênticas a primeira incubação. Após este período, a reação era interrompida com reagente próprio (ácido sulfúrico, 2N) e a placa era então lida com filtro de 450nm, em até 30min. Os valores obtidos foram então correlacionados com uma curva padrão de calibradores fornecido pelo fabricante do kit, que passou pelo mesmo tratamento que o material a ser quantificado.

Para a quantificação do etanol em soro, foram utilizados 15 animais (Tabela 6) diferentes dos animais usados para análise da cotinina plasmática. Da mesma forma que os animais utilizados para quantificação da cotinina em soro, estes animais não foram submetidos ao teste da esQUIVA passiva e os cérebros não foram utilizados para avaliação do sistema colinérgico.

Tabela 6. Animais utilizados para a quantificação de etanol plasmático.

	VEH	ETAN	FUM	FUM+ETAN
Machos	1	3	1	3
Fêmeas	1	3	1	2
TOTAL	2	6	2	5

Em relação á esta quantificação, 30 minutos após a última injeção intraperitoneal, em PN44, os animais foram sacrificados e o sangue coletado. A análise foi feita usando um Kit enzimático. O princípio desse ensaio é baseado na reação realizada pela álcool desidrogenase (ADH). A ADH cataliza a oxidação do etanol a acetaldeído com concomitante redução do NAD a NADH (reação demonstrada abaixo). A mudança na absorbância de 340 nm é diretamente proporcional a concentração de etanol na amostra.



Para o ensaio, foram pipetados 1 ml do reagente (álcool desidrogenase de levedura 200 U/L) nos tubos de ensaio. Nos respectivos tubos foram adicionados 5 µl de padrão, amostras de teste e amostras controle. Nos tubos referentes ao branco foram adicionados 5 µl de solução de cloreto de sódio. Após agitar os tubos, os mesmos foram incubados por 5 minutos. No final do período de incubação, as amostras foram lidas em 340 nm. A absorbância do branco foi subtraída dos valores finais de leitura.

7.6 Análise estatística

Os dados foram compilados como médias e erros padrões. Os resultados foram inicialmente avaliados pela utilização de ANOVAs para cada variável analisada: peso corporal durante a exposição, T3-T0/T0, T24-T0/T0, atividade da ChAT, ligação do HC-3, atividade da AChE. Tratamento e Sexo foram usados como fatores. Para a análise do peso corporal, Dia foi usado como fator de repetição. Para as variáveis comportamentais e neuroquímicas foram feitas ANOVAs para cada idade analisada. ANOVAs de menor ordem foram utilizadas sempre que houve interação entre tratamento e outros fatores. Diferenças entre grupos individuais foram submetidos a análise *post-hoc* pelo teste *Fisher's Protected Least Significant Difference* (FPLSD). O valor de significância assumido foi de $P < 0,05$ para o

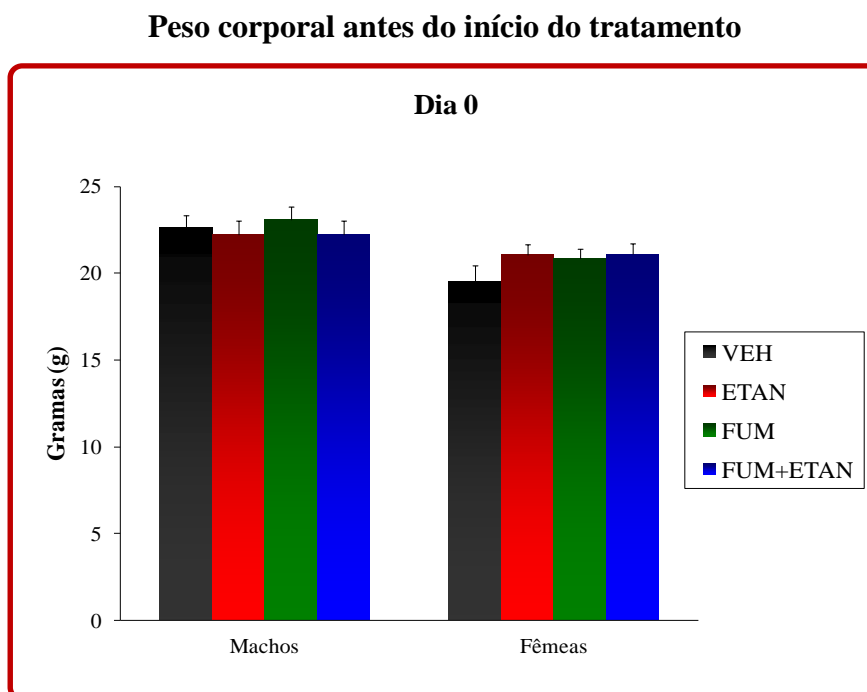
efeito do Tratamento. Para interações a $p < 0,1$ foi avaliado também se efeitos do Tratamento são detectáveis após a subdivisão dos fatores de interação.

8 RESULTADOS

8.1 Efeitos da exposição no peso dos animais

A ANOVA para a variável peso corporal antes do início do tratamento não indicou diferenças entre os quatro grupos estudados (VEH, ETAN, FUM E FUM+ETAN). Nossos resultados mostraram um efeito do sexo ($F= 14,49$; $gl=1$; $P=0,0002$) no qual machos foram mais pesados do que fêmeas antes do início do tratamento (Figura 6).

Figura 6. Peso corporal de todos os animais dos quatro grupos experimentais, machos e fêmeas, antes do início do tratamento

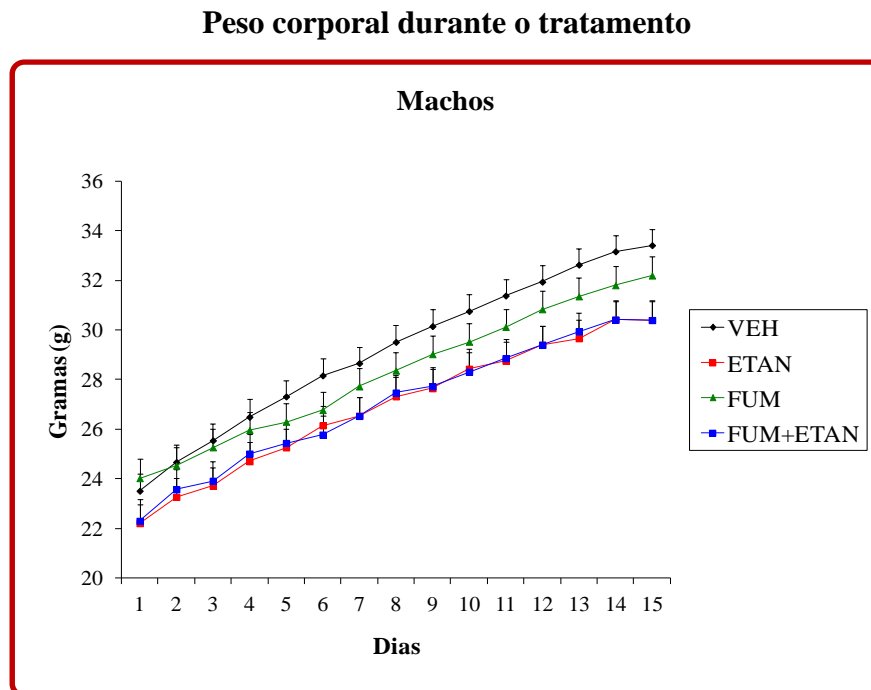


Legenda: Dia 0 foi considerado como sendo a primeira e única pesagem dos animais antes do tratamento. VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

A rANOVA para a variável peso corporal durante a exposição indicou efeito do sexo, ou seja, durante todo o tratamento machos são mais pesados do que as fêmeas. ($F= 46,55$; $gl=1$; $P< 0,0001$). Ao lado disto, foi encontrado interação entre o tratamento e cada dia de tratamento ($F= 1,95$; $gl=3$; $P= 0,0002$). A partir do décimo dia, a rANOVA indicou efeito do tratamento ($F= 2,74$; $gl=3$; $P= 0,0431$), ou seja, animais do grupo ETAN e FUM+ETAN foram diferentes dos animais do grupo VEH durante os cinco últimos dias de tratamento. (Dia 10: $VEH>ETAN$, $P= 0,006$; $VEH>FUM+ETAN$, $P= 0,007$. Dia 11: $VEH>ETAN$, $P= 0,004$;

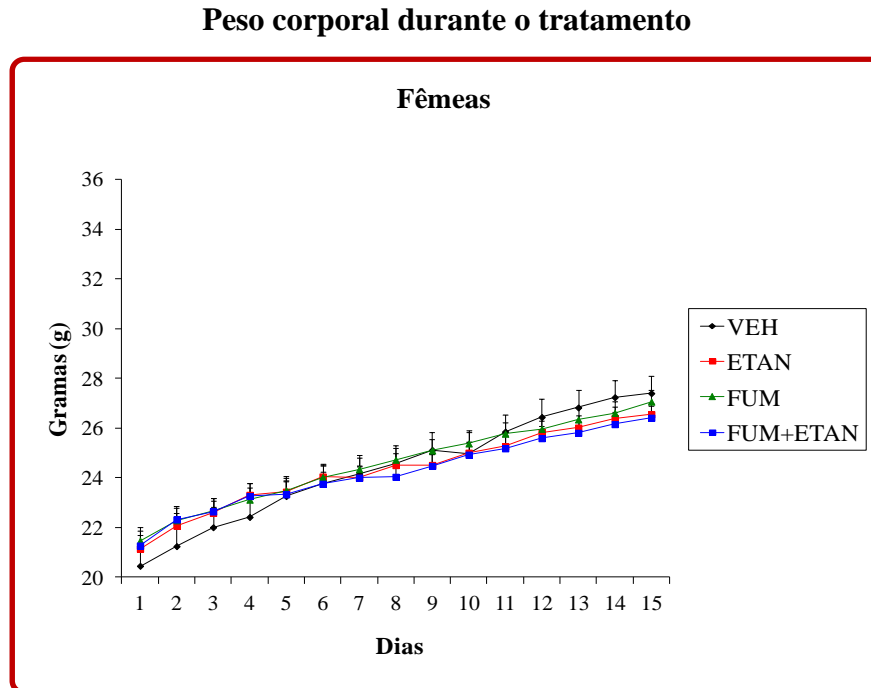
VEH>FUM+ETAN, $P= 0,003$. Dia 12: VEH>ETAN, $P= 0,006$; VEH>FUM+ETAN, $P= 0,002$. Dia 13: VEH>ETAN, $P= 0,001$; VEH>FUM+ETAN, $P= 0,0006$. Dia 14: VEH>ETAN, $P= 0,001$; VEH>FUM+ETAN, $P= 0,0004$. Dia 15: VEH>ETAN, $P= 0,001$; VEH>FUM+ETAN, $P= 0,0006$). Este resultado demonstrou que o etanol administrado isoladamente ou concomitante a fumaça do cigarro causa redução do peso corporal quando comparado ao peso dos animais controle tanto de machos como de fêmeas (Figura 7 e 8).

Figura 7. Peso corporal de todos os machos dos quatro grupos experimentais durante o tratamento



Legenda: Dias representa os 15 dias de tratamento. VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

Figura 8. Peso corporal de todas as fêmeas dos quatro grupos experimentais durante o tratamento



Legenda: Dias representa os 15 dias de tratamento. VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

8.2 Cotinina e etanol plasmáticos

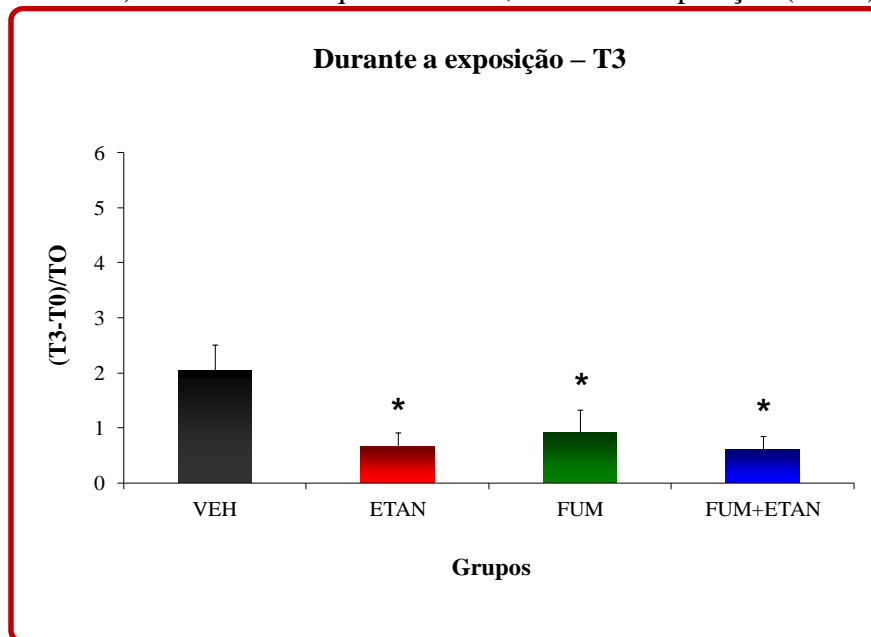
Nossos resultados mostraram que 30 minutos após a última injeção intraperitoneal de álcool etílico a 2g/kg, em PN44, não houve diferença no nível de etanol plasmático entre os animais dos grupos ETAN ($156,1 \pm 20,0$ mg/dl) e FUM+ETAN ($173,9 \pm 29,7$ mg/dl). Os animais dos grupos FUM e VEH apresentaram níveis de etanol não detectáveis. Em relação ao nível de cotinina plasmática, não encontramos diferenças entre os animais dos grupos FUM ($68,3 \pm 7,0$ ng/ml) e FUM+ETAN ($62,2 \pm 8,8$ ng/ml). Os níveis dos animais dos grupos expostos a ETAN e VEH apresentaram níveis de cotinina abaixo do limite de detecção da técnica (<8 ng/ml).

8.3 Teste comportamental

Durante o período de exposição, houve alteração na memória/aprendizado dos animais expostos tanto 3 horas (T3 - Tratamento: $F= 4,32$, g.l. = 3, $P=0,007$) quanto 24 horas (T24 - Tratamento: $F= 3,22$, g.l. = 3, $P=0,028$) após a sessão inicial.

Em T3, os animais dos grupos ETAN, FUM e FUM+ETAN apresentaram menor latência para descer da plataforma quando comparados a animais do grupo VEH (ETAN vs. VEH: $P=0,009$; FUM vs. VEH: $P=0,024$; FUM+ETAN vs. VEH: $P=0,007$, FPLSD) (Figura 9). Em T24, os animais dos grupos FUM e FUM+ETAN apresentaram menor tempo de latência quando comparados aos animais do grupo VEH (FUM vs. VEH: $P=0,049$; FUM+ETAN vs. VEH $P=0,027$, FPLSD) (Figura 10).

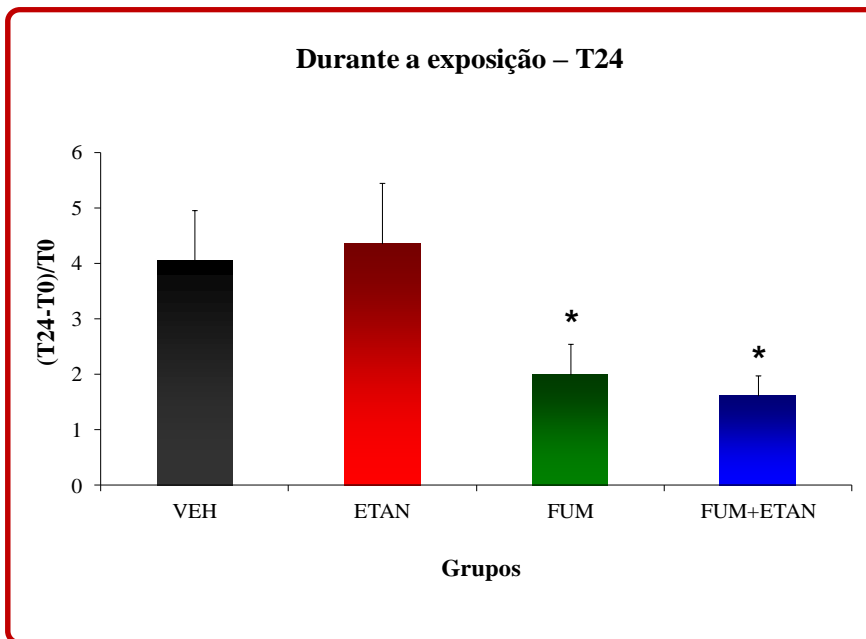
Figura 9. Latência para descer da plataforma na segunda sessão experimental (T3 = 3 horas após a primeira sessão) no Teste da Esquiva Passiva, durante a exposição (PN44).



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. T3-T0/T0 índice corrigido pela latência encontrada na primeira sessão experimental.

* Diferença significativa quando comparados ao grupo VEH.

Figura 10. Latência para descer da plataforma na terceira sessão experimental (T24 = 24 horas após a primeira sessão) no Teste da Esquiva Passiva, durante a exposição (PN45).

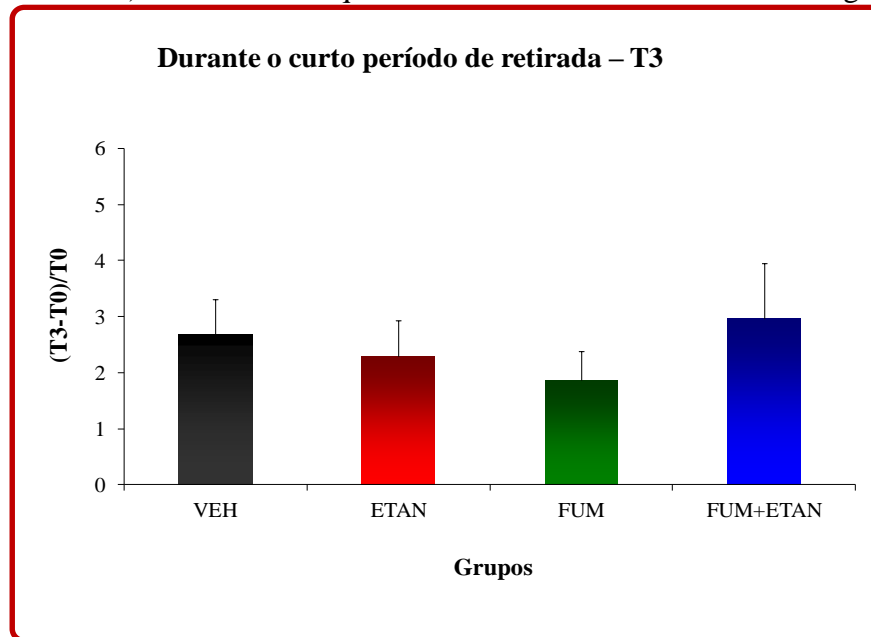


Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. T24-T0/T0 índice corrigido pela latência encontrada na primeira sessão experimental.

* Diferença significativa quando comparados ao grupo VEH.

Já durante um curto período de retirada das drogas, não encontramos diferenças significativas na memória/aprendizado três horas após o teste inicial (T3) (Figura 11).

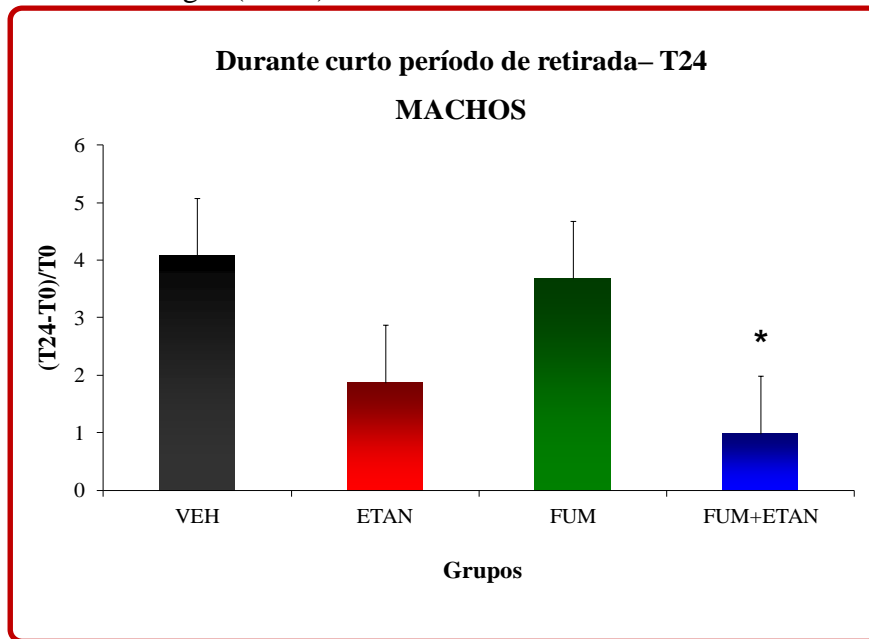
Figura 11. Latência para descer da plataforma na segunda sessão experimental (T3 =3 horas após a primeira sessão) no Teste da Esquiva Passiva durante a retirada das drogas (PN49)



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. T3-T0/T0 índice corrigido pela latência encontrada na primeira sessão experimental.

Ainda durante a retirada das drogas, vinte e quatro horas após o teste inicial, as alterações na memória/aprendizado variaram em função do sexo dos animais (T24 – Tratamento \times Sexo: $F= 4,167$, $g.l.=3$, $P= 0,008$). Quando fizemos a análise em separado para machos e fêmeas verificamos que camundongos machos FUM+ETAN apresentaram menor tempo de latência quando comparados com os machos VEH ($P=0,017$, FPLSD) (Figura 12). Não encontramos diferença significativa para as fêmeas (Figura 13).

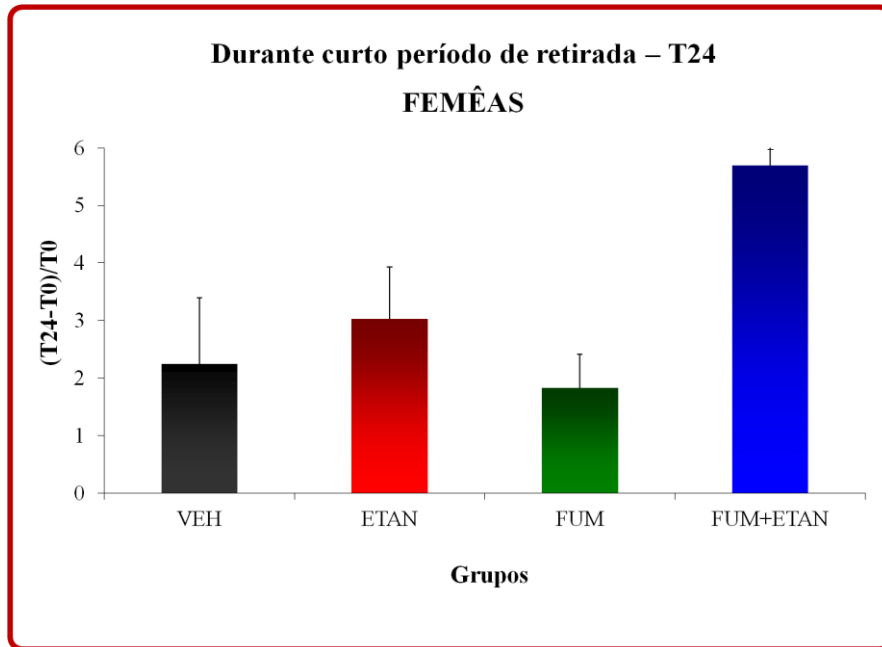
Figura 12. Latência para descer da plataforma, relativa aos machos, na terceira sessão experimental (T24 - 24 horas após a primeira sessão) no Teste da Esquiva Passiva durante o período de retirada das drogas (PN50)



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. T24-T0/T0 índice corrigido pela latência encontrada na primeira sessão experimental.

* Diferença significativa quando comparados ao grupo VEH.

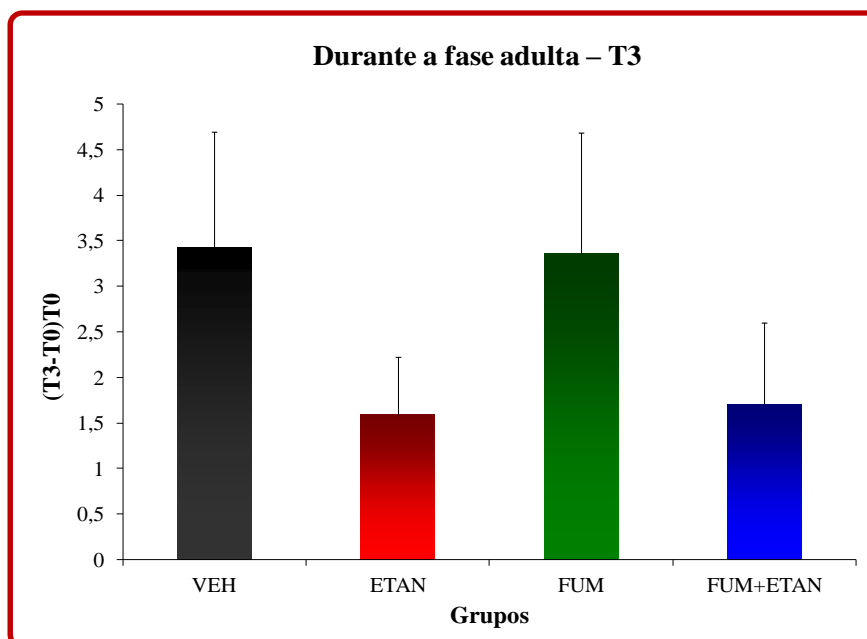
Figura 13. Latência para descer da plataforma, relativa as fêmeas, na terceira sessão experimental (T24 - 24 horas após a primeira sessão) no Teste da Esquiva Passiva durante o período de retirada das drogas (PN50).



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. T24-T0/T0 índice corrigido pela latência encontrada na primeira sessão experimental.

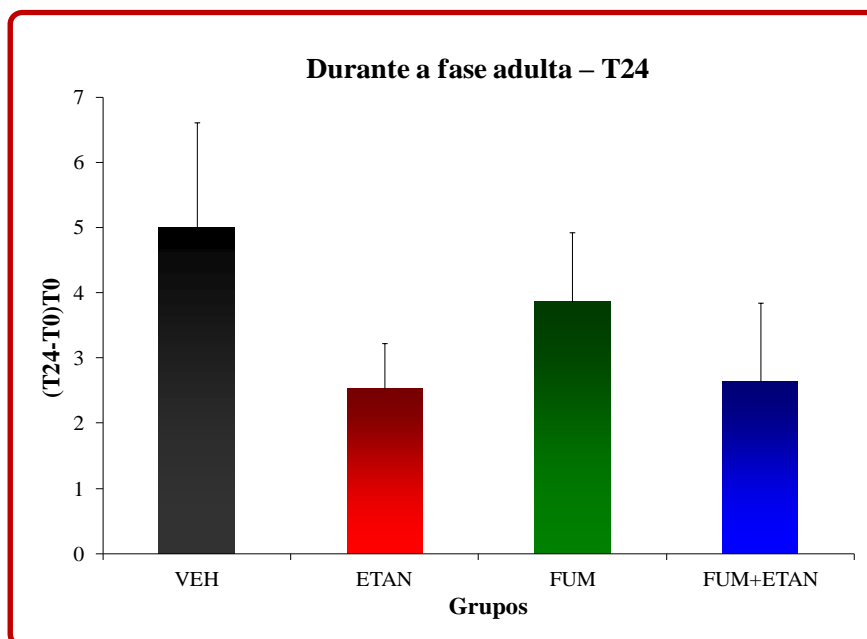
Em relação ao teste comportamental realizado na fase adulta, a ANOVA indicou que não houve diferenças significativas entre os grupos ETAN, FUM, FUM+ETAN e VEH tanto na primeira sessão quanto na terceira sessão de teste, T3 e T24, respectivamente (Figuras 14 e 15).

Figura 14. Latência para descer da plataforma na segunda sessão experimental (T3 - 3 horas após a primeira sessão) no Teste da Esquiva Passiva durante a fase adulta dos animais (PN75)



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. T3-T0/T0 índice corrigido pela latência encontrada na primeira sessão experimental.

Figura 15. Latência para descer da plataforma na terceira sessão experimental (T24 - 24 horas após a primeira sessão) no Teste da Esquiva Passiva durante a fase adulta dos animais (PN75).



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. T24-T0/T0 índice corrigido pela latência encontrada na primeira sessão experimental.

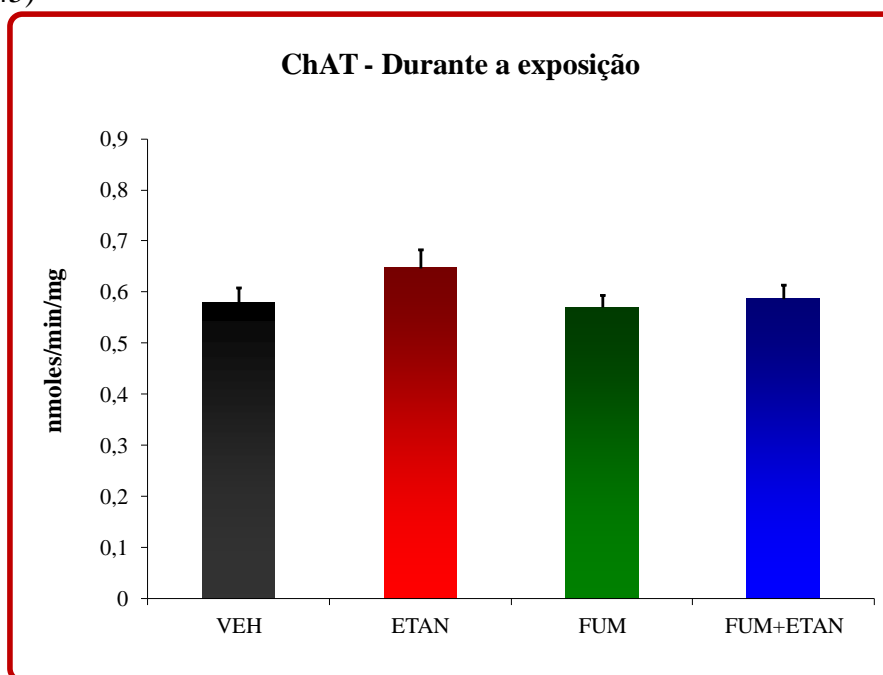
8.4 Análise Neuroquímica

8.4.1 Colina Acetiltransferase (ChAT)

- **Durante a exposição**

Em PN45, não observamos alterações significativas na atividade da ChAT (Figura 16).

Figura 16. Atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) durante a exposição das drogas (PN45)

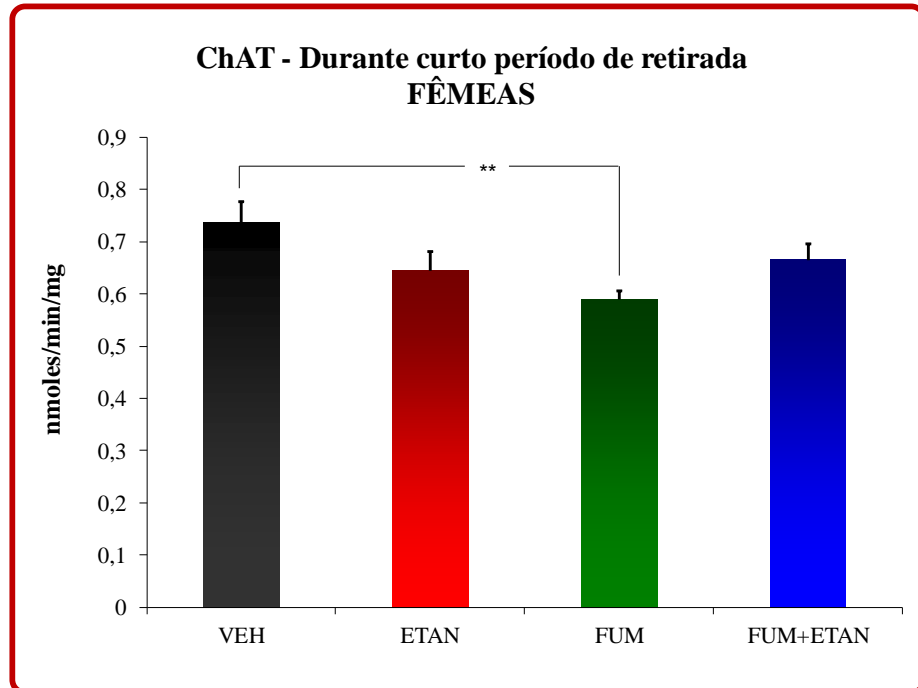


Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

- **Durante curto período de retirada**

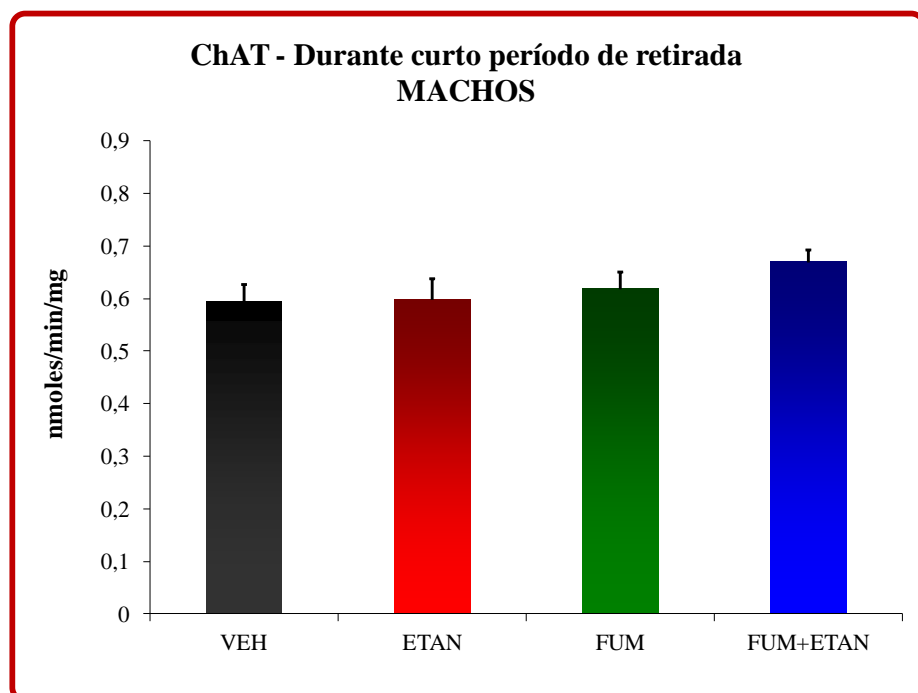
Durante o curto período de retirada (PN50), a atividade da ChAT variou em função do sexo dos animais (Tratamento x Sexo: $F=2,668$, $gl=3$; $p=0,0566$). Quando fizemos a análise em separado para machos e fêmeas, verificamos que as fêmeas expostas à fumaça de cigarro (grupo FUM) apresentaram menor atividade da enzima quando comparadas às fêmeas do grupo VEH ($P=0,0029$, FPLSD) (Figura 17). Não houve diferença entre os grupos experimentais em machos (Figura 18).

Figura 17. Atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) em fêmeas, durante curto período de retirada das drogas (PN50).



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. **p<0,01.

Figura 18. Atividade da enzima Colina Acetil Transferase (ChAT) em machos, durante curto período de retirada das drogas (PN50).

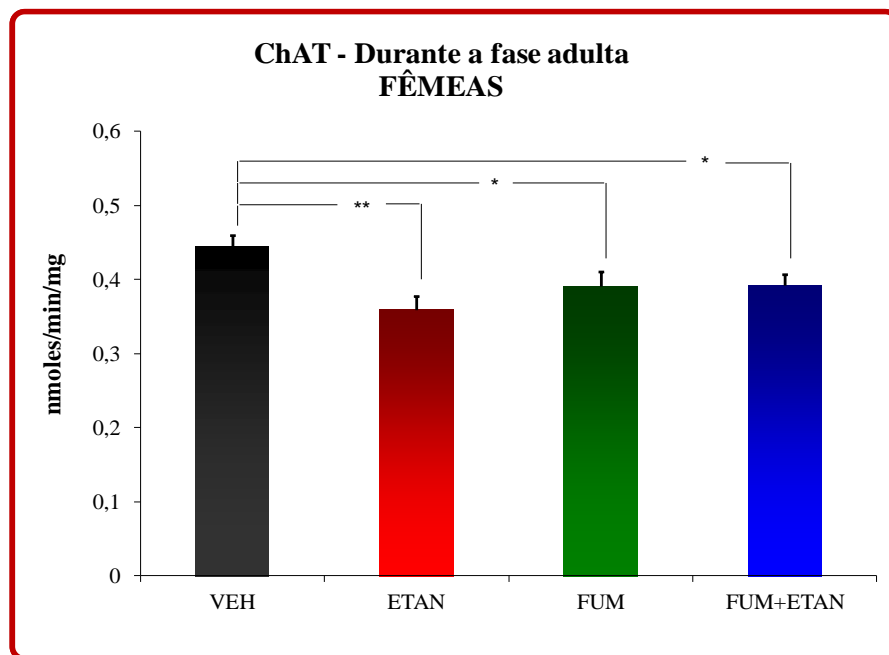


Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/ i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

- **Durante a fase adulta**

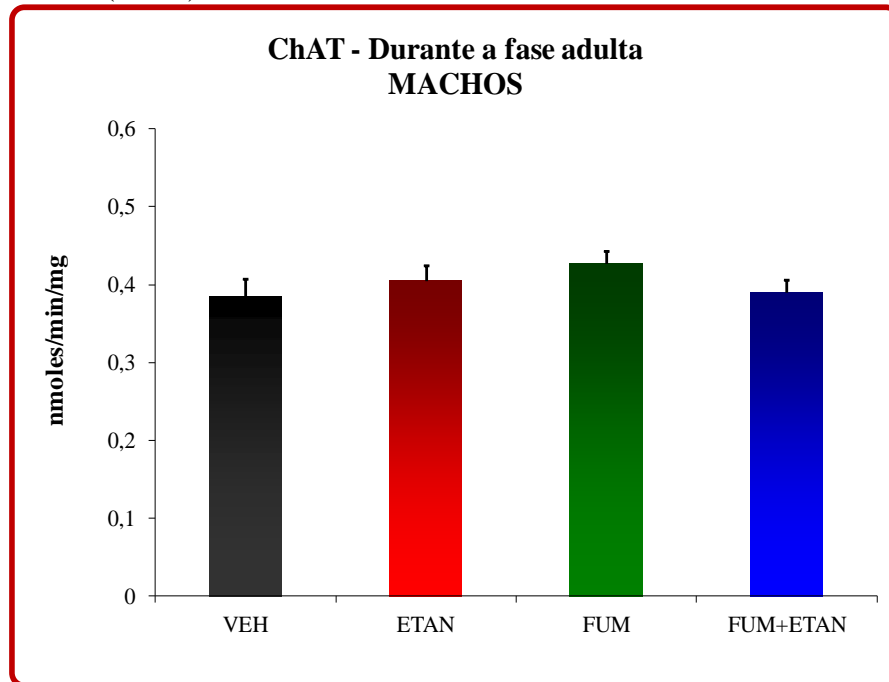
Na fase adulta (PN75), novamente a atividade da ChAT variou em função do sexo (Tratamento x Sexo: $F=2,788$; $gl=3$; $P=0,0487$). Após separação pelos sexos, as fêmeas de todos os grupos tratados (com fumaça de cigarro, etanol e as duas drogas concomitantemente), apresentaram redução da ChAT quando comparadas às fêmeas grupo VEH (ETAN<VEH, $P= 0,0022$; FUM<VEH, $P=0,0492$; FUM+ETAN<VEH, $P=0,048$) (Figura 19). Não encontramos diferença entre os grupos experimentais em machos (Figura 20).

Figura 19. Atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) em fêmeas, durante a fase adulta dos animais (PN75)



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

Figura 20. Atividade da enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) em machos, durante a fase adulta dos animais (PN75)



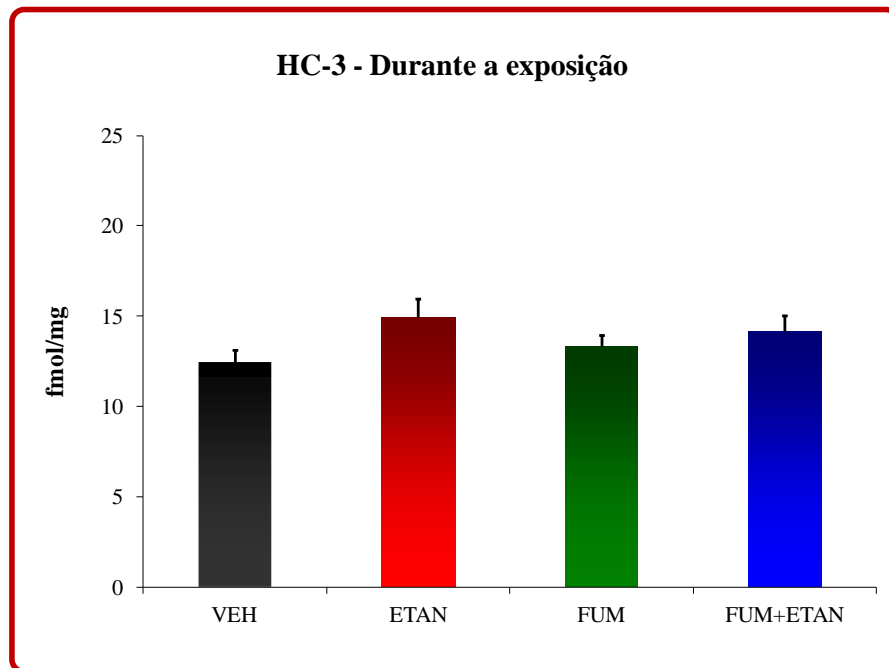
Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

8.4.2 Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina

- **Durante a exposição**

Em PN45, não observamos alterações significativas na ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina (Figura 21).

Figura 21. Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina durante a exposição às drogas (PN45).

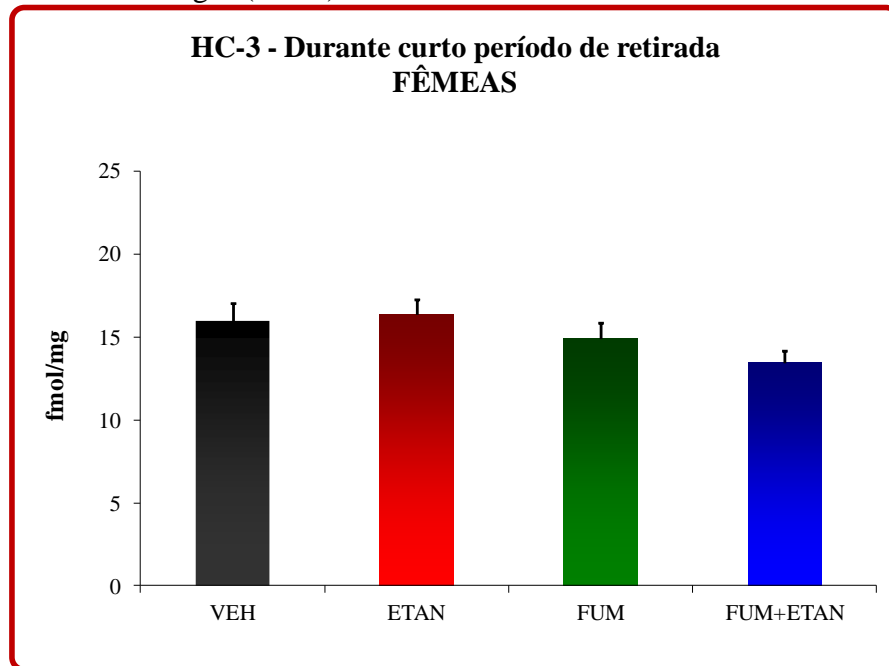


Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

- **Durante curto período de retirada**

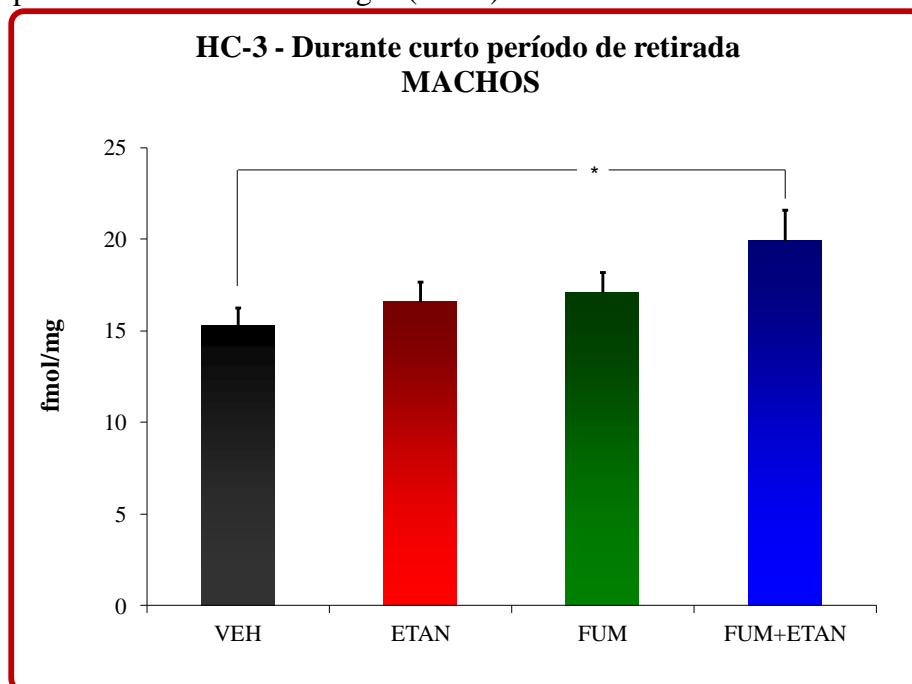
Durante o curto período de retirada (PN50), a ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina variou em função do sexo dos animais (Tratamento x Sexo: $F=4,002$, $gl=3$; $p=0,0115$). Uma vez que os efeitos do tratamento variaram em função do sexo, em seguida analisamos machos e fêmeas em separado. Quando fizemos a análise em separado não encontramos diferença entre os grupos em relação as fêmeas (Figura 22). Porém, verificamos que os machos expostos à fumaça de cigarro juntamente com etanol (grupo FUM+ETAN) apresentaram maior ligação do [3H]HC-3 ao transportador de colina quando comparados aos animais do grupo VEH ($P=0,0140$, FPLSD) (Figura 23).

Figura 22. Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina em fêmeas, durante curto período de retirada das drogas (PN50)



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

Figura 23. Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina em machos, durante curto período de retirada das drogas (PN50).

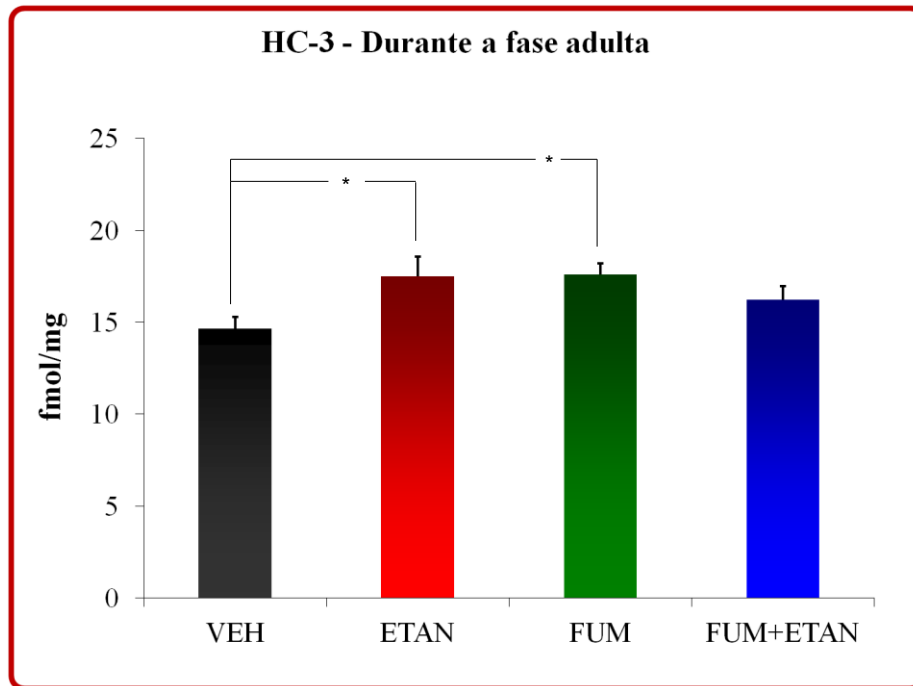


Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. *P< 0,05.

- **Durante a fase adulta**

Durante a fase adulta dos animais (PN75), a ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina variou em função do tratamento (Tratamento: $F=3,111$, $gl=3$; $p=0,0336$). Observamos que animais, tanto machos como fêmeas, expostos a fumaça de cigarro ou ao etanol, ou seja, animais dos grupos FUM ($P=0,0131$, FPLSD) e ETAN ($P=0,0137$, FPLSD) respectivamente, tiveram maior ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina quando comparados aos animais do grupo VEH (Figura 24).

Figura 24. Ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina durante a fase adulta dos animais (PN75).



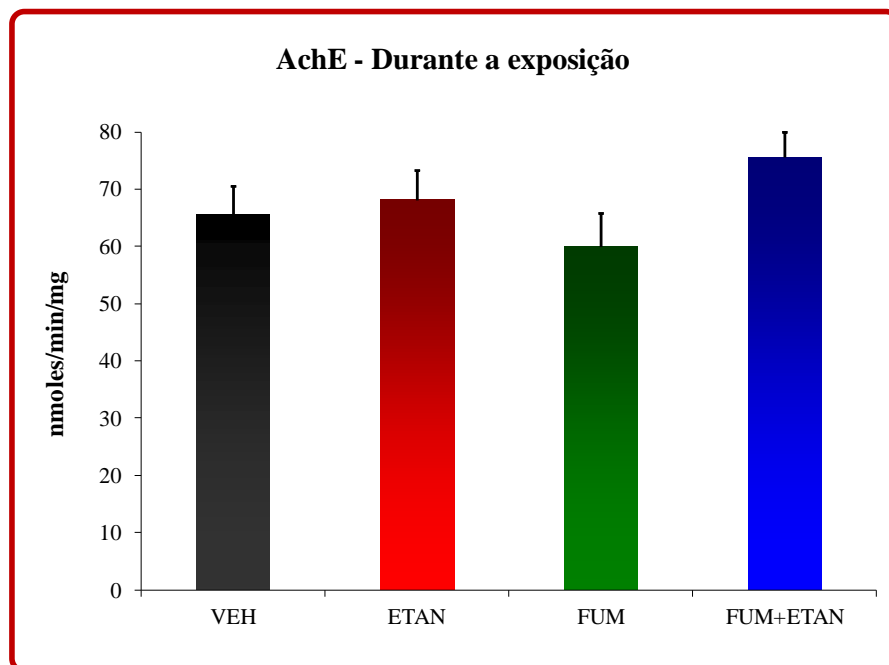
Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. * $P < 0,05$.

8.4.3 Acetilcolinesterase (AChE)

- **Durante a exposição**

Em relação a atividade da AChE durante o período de exposição as drogas, não encontramos diferenças significativas entre os quatro grupos de tratamento, VEH, FUM, ETAN e FUM+ETAN (ausência de efeito de tratamento e interações com tratamento) (Figura 25).

Figura 25. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) durante o período de exposição das drogas (PN45)

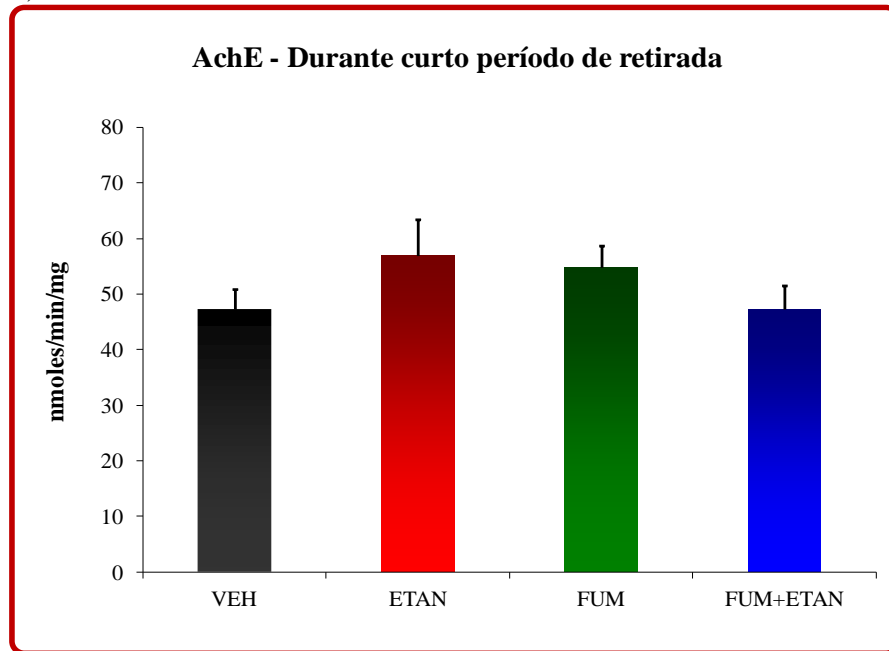


Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

- **Durante curto período de retirada**

Em relação a atividade da AChE durante curto período de retirada das drogas, não encontramos diferenças significativas entre os quatro grupos de tratamento, VEH, FUM, ETAN e FUM+ETAN (ausência de efeito de tratamento e interações com tratamento) (Figura 26).

Figura 26. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) durante o curto período de retirada das drogas (PN50)

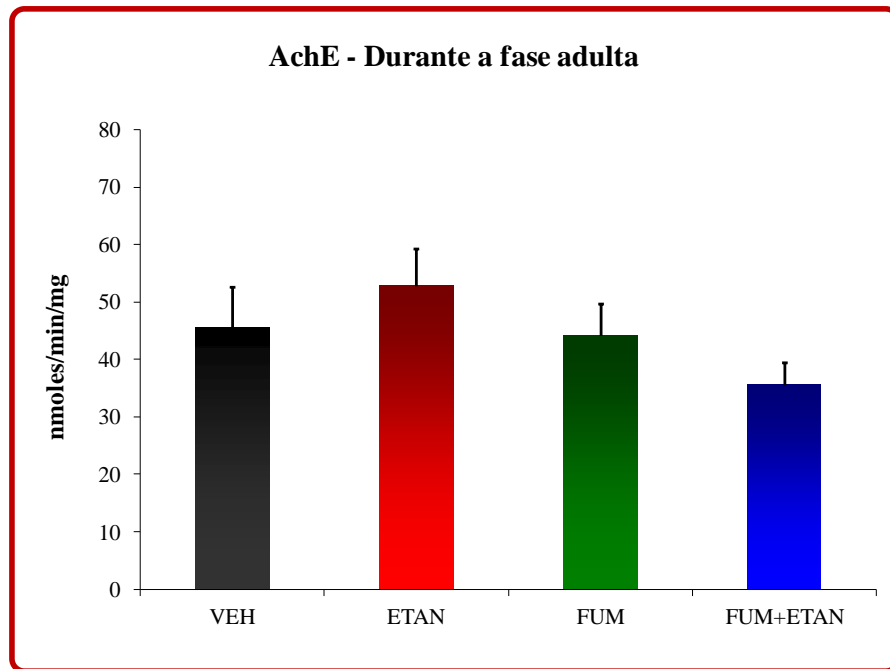


Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

- **Durante a fase adulta**

Em relação a atividade da AChE durante a fase adulta dos animais, não encontramos diferenças significativas entre os quatro grupos de tratamento, VEH, FUM, ETAN e FUM+ETAN (ausência de efeito de tratamento e interações com tratamento) (Figura 27).

Figura 27. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) durante a fase adulta (PN75)



Legenda: VEH = Grupo Veículo, ETAN = Grupo exposto a etanol 2g/kg i.p, FUM = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p. e FUM+ETAN = Grupo exposto a fumaça do cigarro e etanol i.p.

9 DISCUSSÃO

O tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas estão frequentemente associados (Chen e Kandel, 1995; Hughes, 1995; Torabi et al., 1993; Schorling et al., 1994) e são frequentemente co-abusados durante a adolescência. Dados epidemiológicos demonstram que alcoolistas que fumam consomem mais cigarros por dia do que não alcoolistas (Collins, 1990; Collins et al., 1988, 1995, 1996; El Fakahany et al., 1983; Yoshida et al., 1982). Adicionalmente, estudos mostram que o início do hábito de fumar e beber ocorre frequentemente durante a adolescência, período no qual alterações neuroadaptativas, comportamentais e hormonais ocorrem (Lopez et al., 2001). Apesar dos estudos epidemiológicos, pouco é conhecido sobre os substratos neurobiológicos que regem a associação entre estas duas drogas de abuso, principalmente no período crítico no uso de drogas que é a adolescência. Desta forma, é importante entender a relação entre essas duas drogas de abuso. Neste trabalho, fornecemos evidências experimentais de efeitos da fumaça de cigarro, etanol e da combinação destas drogas no comportamento relacionado à memória/aprendizado e no sistema colinérgico tanto durante a exposição de camundongos adolescentes, como também após o término da exposição.

9.1 Escolha do tipo de cigarro para a exposição

Para avaliar os efeitos do consumo de tabaco em animais, diversos estudos utilizam cigarros para pesquisa, estes produzidos somente pela Universidade de Kentucky (Garcia et al., 2012; Rinaldi et al., 2012). Para validar um paralelo com a literatura decidimos utilizar cigarros para pesquisa em detrimento dos industrializados vendidos por exemplo, em postos de gasolina e supermercados. Em especial, os cigarros industrializados mais utilizados e populares, como Marlboro, L&M e Derby apresentam quantidades de nicotina variando entre 0,6 mg e 0,8 mg por cigarro. Desta forma, levando em consideração a quantidade de nicotina presente nestes cigarros, buscamos utilizar um tipo de cigarro para pesquisa que tivesse valores próximos a estes. Assim, escolhemos para serem utilizados os cigarros para pesquisa do tipo 3R4F que apresentam valores de nicotina de 0,73 mg por cigarro. Ao lado disso, este mesmo cigarro é com frequência utilizado na literatura (Koszowski et al., 2009; Adamson et al.,

2011) e inclusive em trabalhos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa (Abreu-Villaça et al., 2010).

9.2 Dose de etanol

Em relação ao etanol, escolhemos uma dose moderada a ser administrada em dias alternados, visando nos aproximarmos de um padrão intermitente de consumo. Adicionalmente, a dosagem de etanol usada no presente trabalho promoveu concentração plasmática de etanol média equivalente às encontradas em humanos adolescentes após terem consumido doses consideradas moderadas de etanol (Eckardt et al., 1998). Estes resultados demonstram que o modelo de exposição usado, inclusive em trabalhos anteriores (Abreu-Villaça et al., 2006, 2007, 2008; Manhães et al., 2008), pode simular os níveis de exposição ao etanol observado em adolescentes humanos.

9.3 Concentração de etanol e cotinina no sangue

No presente estudo, de acordo com modelo experimental utilizado recentemente pelo nosso laboratório (Abreu-Villaça et al., 2010), a fumaça do cigarro foi administrada aos animais através da queima de cigarros para pesquisa (3R4F) em uma máquina de fumaça de cigarro (Teague Enterprises, Davis, CA), enquanto que injeções i.p. de etanol foram aplicadas em dias alternados. Este desenho experimental teve como objetivo mimetizar o padrão de consumo de drogas por humanos adolescentes. Por isso, decidimos que a exposição à fumaça de cigarro seria durante um período de 8h/dia, levando em consideração que fumantes fumam durante o dia e interrompem o consumo durante o sono. Em relação ao etanol, escolhemos uma dose moderada a ser administrada em dias alternados, visando nos aproximarmos de um padrão intermitente de consumo. Neste sentido, a avaliação do nível de exposição ao tabaco e ao etanol é de fundamental importância para as interpretações dos resultados do presente estudo, pois indica o grau de exposição e identifica possíveis interações farmacocinéticas entre nicotina e etanol. Para esta avaliação, utilizamos a dosagem de cotinina, um metabólito

da nicotina, que pode ser usado para medir a exposição ao tabaco (Binnie et al., 2004) e etanol em soro.

Nossos resultados indicaram que a exposição ao tabaco gerou níveis de cotinina em soro equivalentes aos encontrados em fumantes adolescentes (Caraballo et al., 2004; Wood et al., 2004). Em relação a dosagem de etanol utilizada neste trabalho, esta promoveu concentração plasmática de etanol média equivalente às encontradas em humanos adolescentes após terem consumido doses consideradas moderadas de etanol (Eckardt et al., 1998). Portanto, estes resultados demonstram que o modelo de exposição utilizado pode simular os níveis de exposição ao tabaco e ao etanol observado em adolescentes humanos.

Interações farmacocinéticas entre a nicotina e o etanol poderiam afetar os resultados encontrados devido à exposição combinada as drogas neste estudo. Porém, no presente estudo, os níveis de cotinina não foram diferentes entre os grupos FUM e FUM+ETAN. Da mesma forma, a concentração de etanol no sangue não foi afetada pela exposição à fumaça de cigarro. Estes achados estão de acordo com a literatura, que mostra que a concentração do etanol quando administrado i.p. não é afetada pela exposição concomitante a nicotina (Parnell et al., 2006), como também, sugere que a nicotina não afeta a taxa de eliminação do etanol (Collins et al., 1988). Ao lado disso, estudos demonstram que a nicotina utilizada cronicamente não altera a concentração de etanol se este for administrado de modo intravenoso (Hisaoaka e Levy, 1985). Não podemos excluir a ocorrência de interações metabólicas entre nicotina e etanol; contudo, de acordo com os resultados encontrados e uma vez que neste trabalho foram utilizadas injeções intraperitoneais de etanol, é pouco provável que apenas interações metabólicas possam explicar os dados obtidos na memória/ aprendizado e no sistema colinérgico.

9.4 Alterações no peso dos animais

Para verificar se houve diferenças entre os grupos mesmo antes de iniciar o tratamento, avaliamos o peso corporal dos animais antes do início do tratamento sendo que não encontramos diferenças entre o ganho de peso corporal dos quatro grupos estudados (VEH, ETAN, FUM E FUM+ETAN).

Durante a exposição, o etanol administrado isoladamente ou concomitante a fumaça do cigarro foi capaz de causar redução do ganho de peso corporal dos animais, tanto machos como fêmeas. Este efeito foi observado a partir do décimo dia de tratamento e perdurou até o décimo quinto dia. Estudo realizado durante a fase da adolescência e idade adulta de roedores expostos ao etanol também demonstrou que a exposição reduziu significativamente o ganho de peso corporal tanto durante o período da adolescência como na fase adulta. Neste estudo, a exposição ao etanol foi realizada a cada dois dias, durante o período do 33^o dia de vida pós-natal até o 57^o dia de vida pós natal e o peso corporal dos animais era aferido em dias alternados (Kendig et al., 2011). Diferente do que ocorreu com o peso corporal dos animais, nossos resultados comportamentais e bioquímicos não foram restritos aos grupos ETAN e FUM+ETAN, assim, é pouco provável que a redução no ganho de peso tenha papel relevante na determinação dos demais resultados descritos nesta dissertação.

9.5 Efeitos na memória/aprendizado

- *Durante o período de exposição*

Em relação aos animais que foram submetidos ao teste comportamental ao final do período de exposição (PN44 e PN45) foi observado que a fumaça do cigarro, o etanol e a fumaça do cigarro+etanol promoveram prejuízos na memória e aprendizado como demonstrado pela diminuição do tempo para descer da plataforma. Animais dos grupos FUM, FUM+ETAN e ETAN apresentaram menor latência para descer da plataforma quando comparados aos animais do grupo VEH três horas após a primeira sessão experimental (T3). O mesmo efeito foi observado vinte e quatro horas após a primeira sessão experimental (T24), porém somente animais do grupo FUM e FUM+ETAN apresentaram latência diminuída quando comparados aos animais do grupo VEH. Estes achados sugerem que a fumaça do cigarro isolada ou administrada em conjunto com o etanol provoca déficits tanto na memória de curto como na de longo prazo, diferente da exposição isolada ao etanol, que só provocou danos na memória de curto prazo.

Estes resultados estão de acordo com estudos que têm demonstrado que adolescentes humanos que fumam tabaco diariamente experimentam deficiências agudas nas memórias verbal e operacional durante o fumo ad libitum (Jacobsen et al., 2005). Também em humanos, estudos têm sugerido que o tabagismo crônico, a interrupção abrupta e o tabagismo agudo ou a administração de nicotina podem afetar o desempenho em testes de memória de trabalho (Mendrek et al., 2006). Ao lado disso, Tsukada et al., (2005) mostraram que a administração crônica de nicotina, um dos componentes do tabaco, aumenta a liberação de dopamina no córtex pré-frontal de macacos rhesus adultos e promovem uma pior performance da memória operacional. Em outro estudo realizado também com nicotina, camundongos adolescentes foram expostos à nicotina e ao etanol isoladamente como também às duas drogas em conjunto e avaliados os efeitos das drogas na memória e aprendizado, através do teste da esQUIVA passiva. Como resultado, encontraram que a exposição isolada à nicotina e ao etanol causam danos na memória/aprendizado dos animais e que estes danos são mais severos quando ocorre a exposição combinada a estas drogas (Abreu-Villaça et al., 2007). Quanto ao consumo de etanol, em ratos adolescentes causa danos à memória durante a exposição no teste do labirinto aquático de Morris (Sircar e Sircar, 2005; White, 2005). Pesquisas realizadas para avaliar a função neurocognitiva de adolescentes com idades entre 15 e 19 anos com história de consumo abusivo de álcool, revelam déficits em testes de atenção, linguagem, testes verbais e não-verbais de memória e especificamente deficiências na memória operacional (Heffernan et al., 2010; Schweinsburg et al., 2005; Tapert et al., 2000; Tapert et al., 2002). Adicionalmente, o consumo excessivo de álcool tem sido associado com disfunção do lobo frontal (Caspers et al., 2010; Davies et al., 2005; Fox et al., 2000). Nossos resultados demonstraram que o etanol foi capaz de provocar prejuízos na memória dos animais testados em T3, porém em T24 esse prejuízo não foi observado. Estes dados sugerem que o etanol é capaz de afetar a memória de curto prazo, mas não a de longo prazo. Levando em consideração que os mecanismos de formação da memória de curta duração apresentam diversos mediadores, acreditamos que algum destes mediadores seja afetado pelo consumo de álcool. De acordo com esta hipótese, diversos estudos demonstram que há pelo menos 16 tratamentos diferentes, administrados no hipocampo, quer no córtex entorrinal, quer no córtex parietal superior, que suprimem a memória de curta duração sem reduzir a memória de longa duração (Izquierdo, 2011). Adicionalmente, estudos recentes sugerem

que o álcool e o tabaco pode ter efeitos cognitivos diferentes (Ceballos, 2006; Kalmijn et al., 2002), podendo influenciar diferentes domínios cognitivos (Glass et al., 2009; Schinka et al., 2002). Desta forma, acreditamos que o etanol, afete algum dos mediadores do mecanismo de formação da memória de curta duração prejudicando assim a memória de curta e não a de longa duração.

- ***Durante os períodos de retirada***

Em relação aos animais testados poucos dias após a retirada das drogas (PN49 e PN50), os prejuízos na memória e aprendizado observados durante o final do período de exposição não se mantiveram. Os animais dos grupos FUM, ETAN e FUM+ETAN não apresentaram menor latência para descer da plataforma, quando comparados aos animais do grupo VEH, três horas após a primeira sessão experimental. Porém, em T24, os prejuízos na memória/aprendizado tornaram a ser observados. Apesar dos grupos ETAN e FUM não apresentarem alterações. Machos expostos a fumaça de cigarro juntamente com o etanol (grupo FUM+ETAN) apresentaram menor tempo para descer da plataforma quando comparados aos animais do grupo controle. Este prejuízo não foi observado nas fêmeas. Diferente do descrito no presente estudo, trabalhos anteriores descrevem que a exposição à nicotina durante a adolescência melhora a memória/aprendizado no curto período de retirada, porém a nicotina quando combinada ao etanol não causa alterações (Abreu-Villaça et al., 2007). Levando em consideração que o tabaco possui mais de 4800 componentes e que a nicotina é somente um deles, (Adam et al., 2006; Araújo et al., 2004) podemos sugerir que vários outros componentes podem afetar o efeito da nicotina, sendo que, no presente estudo, a interação entre a nicotina e outros componentes da fumaça de cigarro impediu a melhora cognitiva observada em roedores expostos somente à nicotina neste caso, impedindo o efeito desta substância no presente trabalho. Além disso, o déficit cognitivo observado no grupo FUM+ETAN no presente estudo quando comparado à ausência de danos cognitivos no grupo exposto a nicotina juntamente com o etanol (Abreu-Villaça et al., 2007) pode ter sido causado pela retirada de outros componentes do tabaco, em combinação com a retirada do etanol. Em relação ao etanol, estudos anteriores corroboram nossos achados uma vez que mostram que a sua retirada durante a adolescência não afeta memória e aprendizagem (Abreu-Villaça et al., 2007; Popovic et al., 2004).

Assim, observamos também que após a retirada das drogas, os efeitos da exposição a fumaça de cigarro e etanol na memória e aprendizado permanecem, porém, somente em machos e na memória de longa duração. Como explicado no tópico anterior, a memória de curta duração e de longa duração possuem proteínas cinases diferentes apresentando papel importante no mecanismo de formação destas memórias (Izquierdo, 2011). Dessa forma, neste caso, acreditamos que a fumaça de cigarro juntamente com etanol, em machos, afetem a PKC impedindo a sua atividade e por consequência causando prejuízos a memória de longa duração e não a de curta duração. Levando em consideração que homens fumam mais frequentemente do que mulheres (34% versus 25,1%, respectivamente) (Singer et al., 2011) e que homens, principalmente adolescentes, possuem episódios de consumir álcool mais frequentes (WHOa, 2011), sugerimos que homens sejam mais susceptíveis aos efeitos dessa dupla exposição quando comparados a mulheres. Adicionalmente, relatórios sobre as diferenças de gênero têm sugerido benefícios do uso do álcool sobre a cognição entre as mulheres (Caspers et al., 2010; Glass et al., 2009; McGuire et al., 2007; Leroi et al., 2002).

Em relação aos animais testados durante a fase adulta (PN74 e PN75), os efeitos na memória e aprendizado gerados durante a exposição não persistiram. Ou seja, no teste comportamental, tanto na segunda sessão quanto na terceira sessão de teste, T3 e T24, respectivamente, os animais dos três grupos tratados (ETAN, FUM, FUM+ETAN) não apresentaram diminuição do tempo para descer da plataforma (latência) quando comparados aos animais do grupo não tratado (VEH). Curiosamente, a persistência dos déficits de memória/aprendizado causados pela fumaça de cigarro e pelo etanol era esperada. Trabalhos realizados com nicotina demonstraram que os sintomas de retirada em adolescentes são piores que em adultos (Elders et al., 1994). Ao lado disto, estudos em animais indicam que adolescentes e adultos são diferentes em diversos aspectos da exposição ao etanol. Tem sido observado que adolescentes são mais sensíveis a hipotermia (Ristuccia e Spear, 2008) e a deficiências na memória por danos no hipocampo, induzidos pela exposição ao etanol do que adultos (Markwiese et al., 1998). Contudo, corroborando nossos resultados, um estudo realizado com camundongos, animais adolescentes foram expostos a nicotina e ou etanol e avaliados os efeitos desta exposição como também durante um longo período de retirada (um mês) das drogas na

memória/aprendizado. Encontraram que os danos na memória/aprendizado causados tanto pela nicotina quanto pelo etanol não persistiram um mês após a exposição (Abreu-Villaça et al., 2007).

9.6 Efeitos no sistema colinérgico

A exposição a fumaça de cigarro, etanol e às duas drogas em conjunto não foram capazes de provocar alterações nos três marcadores colinérgicos avaliados, sendo eles a ChAT, o HC-3 e a AChE.

Durante o curto período de retirada das drogas, a fumaça de cigarro foi capaz de diminuir a atividade da ChAT em fêmeas. O mesmo efeito não encontramos em machos. Em relação ao HC-3, à fumaça de cigarro juntamente com etanol foi capaz de aumentar o número de ligações do [3H] HC-3 ao transportador de colina, em machos. Em relação a atividade da AChE, durante esse mesmo período, as drogas administradas não foram capazes de alterar a atividade desta enzima.

Durante a fase adulta, as drogas administradas isoladamente ou em conjunto foram capaz de reduzir a atividade da ChAT, em fêmeas. Nesta mesma fase, a fumaça de cigarro e o etanol, isoladamente, foram capazes também de aumentar o número de ligações do [3H] HC-3 ao transportador de colina. Em relação a atividade da AChE, durante esse mesmo período, as drogas administradas não foram capazes de alterar a atividade desta enzima.

Considerando que a ChAT, enzima responsável pela biossíntese da acetilcolina, é um marcador constitutivo da sinapse colinérgica (Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009; Aubert et al., 1996; Happe e Murrin, 1992; Zahalka et al., 1992, 1993), a redução da ChAT indica perda da inervação colinérgica, podendo refletir morte de neurônios (Trauth et al., 2000). Já o aumento da ChAT sugere aumento da densidade de inervação colinérgica. A estimulação colinérgica excessiva altera os padrões de replicação celular, diferenciação e sinaptogênese (Levin e Slotkin, 1998; Slotkin, 2002, 2004), podendo progredir para dano celular (Abreu-Villaça et al., 2003b; Abrous et al., 2002; Slotkin, 2002, 2004). Apesar de não termos encontrado alteração na atividade da ChAT durante a exposição, após curto período de retirada, a fumaça de cigarro promoveu uma diminuição da atividade da ChAT somente em fêmeas. Desta forma, a redução

encontrada na atividade da ChAT pode refletir a maior susceptibilidade das fêmeas aos efeitos negativos tardios da fumaça de cigarro. Por exemplo, mulheres fumantes adolescentes possuem um início mais rápido na geração de dependência pela nicotina (DiFranza et al., 2002) e muitos estudos em animais sugerem que fêmeas são mais sensíveis ao dano celular promovido pela exposição à nicotina durante a adolescência (Abreu-Villaça et al., 2003b; Trauth et al., 1999, 2000). Em relação ao etanol, estudos anteriores contrariamente mostram que a exposição ao etanol promove diminuição da atividade da ChAT porém, apenas quando o período de exposição é consideravelmente longo (Arendt et al., 1988; Floyd et al., 1997). Neste sentido, este resultado sugere que a exposição a fumaça de cigarro provocou dano colinérgico tardio, ou seja após a exposição. Sugerindo assim que em fêmeas, durante o curto período de retirada das drogas, ocorre perda da inervação colinérgica, provavelmente em resposta à exposição a fumaça de cigarro. Adicionalmente, apesar de a fumaça do cigarro promover redução da atividade da ChAT nas fêmeas, a co-exposição não foi capaz de gerar dano na inervação colinérgica, o que sugere um efeito protetor do etanol. Apesar da exposição combinada no presente estudo não ter sido capaz de alterar a atividade da ChAT e de alterações também não terem sido identificadas durante o curto período de retirada, a investigação da toxicidade da dupla exposição as drogas tem se demonstrado controversa. Jang e colaboradores (2002) demonstraram que a exposição combinada de nicotina e etanol promove um efeito mais potente quando comparado com a exposição separada de cada droga. Entretanto nosso grupo de pesquisa demonstrou que a exposição combinada promoveu efeitos menos severos na morte celular (Oliveira-da-Silva et al., 2009). Jamal et al., 2010, ao examinarem os efeitos da dupla exposição a nicotina e ao etanol também não encontraram alterações na ChAT, durante a exposição a estas drogas.

Durante a fase adulta, ou seja, após 30 dias de retirada das drogas, a redução da atividade ChAT observada em PN50 se manteve nas fêmeas expostas a fumaça de cigarro. Além disso, foi observada redução tardia da atividade da ChAT também nas fêmeas expostas ao etanol e às duas drogas em conjunto. Considerando que a diminuição da ChAT está associada com a perda de inervação colinérgica, o presente estudo fornece evidencia experimental de que a exposição combinada de fumaça de cigarro e etanol como das duas drogas isoladamente promove perda da inervação colinérgica a longo prazo. Estes dados sugerem que ocorre perda tardia da inervação

colinérgica como também que o efeito protetor do etanol não permanece até a fase adulta.

A ligação do HC-3 ao transportador pré-sináptico de colina é responsiva a atividade colinérgica, sendo que quanto maior a atividade, maior a ligação do HC-3 ao transportador (Simon et al., 1976; Klemm and Kuhar, 1979). Quanto ao HC-3, como encontrado na ChAT, a exposição às drogas isoladas ou em conjunto não foi capaz de gerar alterações durante o período de exposição. Nossos resultados corroboram com estudos que demonstraram que a exposição à nicotina e ao etanol e às duas drogas em conjunto durante a fase da adolescência, em camundongos, não foi capaz de gerar alterações na ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina, durante o período de exposição (Ribeiro-Carvalho et al., 2008). Em contrapartida, durante o período de retirada, um estudo anterior demonstrou redução da ligação ao HC-3 em animais expostos ao etanol e à nicotina+etanol (Ribeiro-Carvalho et al., 2009), resultado este que difere do identificado no presente estudo, onde durante o curto período de retirada das drogas encontramos um efeito sexo-dependente, no qual machos expostos a fumaça de cigarro em combinação ao etanol apresentaram aumento da ligação do [3H] HC-3 ao transportador de colina enquanto que na fase adulta, ou seja, 30 dias após a retirada das drogas, esse efeito aparece nos outros dois grupos de tratamento (ETAN e FUM) e não mais de maneira sexo-dependente e no grupo FUM+ETAN. Levando em consideração que o tabaco apresenta diversos componentes além da nicotina (Adam et al., 2006; Araújo et al., 2004), pode-se levantar a hipótese de que estes componentes determinem as diferenças encontradas nos grupos expostos à fumaça vs. nicotina. Entretanto, as diferenças observadas no grupo etanol do estudo anterior (Ribeiro-Carvalho et al., 2009) quando comparado ao grupo etanol do presente estudo durante os períodos de retirada devem ter outra explicação. É possível que a manipulação diária dos animais experimentais, os quais eram levados e trazidos do biotério a sala de exposição à fumaça ou ar tenham influenciado os resultados.

A regulação da acetilcolina ocorre no cérebro por diferentes vias metabólicas que incluem ativação ou inibição da colina acetiltransferase (ChAT) e da acetilcolinesterase (AChE). A ChAT sintetiza a acetilcolina através de compostos acetil CoA e colina nos neurônios, a enzima AChE converte acetilcolina em metabólitos inativos de colina e acetato na fenda sináptica. Entretanto, decréscimos na função colinérgica estão associados com diversas doenças como Alzheimer, Parkinson,

esquizofrenia e autismo (Jamal et al., 2010; Dani et al., 2007). No presente estudo, a fumaça de cigarro, o etanol e as duas drogas em conjunto não foram capazes de provocar alterações na atividade da AChE, durante a adolescência, curto período de retirada e durante a fase adulta. Em outro estudo, a exposição ao etanol intraperitonealmente também não foi capaz de alterar a atividade da AChE no hipocampo e no córtex cerebral (Jamal et al., 2010). Ao avaliar os efeitos da nicotina na fase adulta de camundongos, neste caso, PN90, estudo recente não observou alterações na AChE (Nunes-Freitas et al., 2011). Desta forma, nossos resultados sugerem que a fumaça de cigarro, o etanol e as duas drogas em conjunto não alteram a conversão da acetilcolina em metabólitos inativos de colina e acetato na fenda sináptica, nos três momentos avaliados.

CONCLUSÕES

As avaliações de parâmetros colinérgicos demonstraram alterações somente após o término da exposição às drogas, tanto no curto período de retirada quanto na fase adulta. Em contrapartida, a avaliação da memória/aprendizado indicou resultados robustos ao final do período de exposição, sendo alguns resultados extensivos ao curto período de retirada, contudo, não houve alterações comportamentais na fase adulta. Este resultados sugerem que apesar de estudos anteriores associarem tanto o sistema colinérgico quanto o hipocampo à alterações na memória/aprendizado (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2003b, 2004; Trauth et al., 2000a, 2001), em nosso, estudo, esta associação não ficou clara. De fato, a única coincidência entre alterações bioquímicas e comportamentais ocorreu durante o curto período de retirada, quando machos do grupo FUM+ETAN apresentaram prejuízo cognitivo em T24 e aumento da atividade colinérgica, observada com aumento no HC-3. É possível que a avaliação de outros parâmetros como a expressão de diferentes subtipos de nAChR mostre mais claramente uma associação entre o sistema colinérgico hipocampal e o comportamento. Outra possibilidade é que alterações em outros sistemas de neurotransmissores expliquem os resultados comportamentais. Nesse sentido, o sistema glutamatérgico pode ser futuramente avaliado.

Resultados deste estudo puderam fornecer informações necessárias para educar adolescentes sobre os efeitos deletérios do cigarro e do consumo de bebidas alcoólicas, fornecendo evidências que a fumaça do cigarro e o etanol causam déficits cognitivos e alterações no sistema colinérgico em desenvolvimento. Assim, podemos concluir com este estudo que:

Memória e aprendizado

- FUM, ETAN e FUM+ETAN causaram prejuízo na memória/aprendizado de camundongos adolescentes durante a exposição.
- Déficits persistiram durante o curto período de retirada somente no grupo FUM+ETAN.

Sistema colinérgico

ChAT

- Perda de terminais dependente do sexo (fêmeas mais suscetíveis).
- Perda tardia (fase adulta) de terminais nos grupos FUM, ETAN, FUM+ETAN.

Ligação do HC-3 ao transportador de colina

- Aumento da atividade colinérgica:
 - Curto período de retirada: somente FUM+ETAN em machos;
 - Fase adulta: FUM+ETAN.

REFERÊNCIAS

- 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*, 2003a; 28: 1935-1949.
- Abreu-Villaça Y, 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.*2010,12(7):776-80.
- Abreu-Villaça Y, Medeiros AH, Lima CS, Faria FP, Filgueiras CC, Manhães AC. Combined Exposure to Nicotine and Ethanol in Adolescent Mice Differentially Affects Memory and Learning during Exposure and Withdrawal. *Behavioural Brain Research*, 2007; 181: 136-146.
- 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*, 2008; 33: 599-610.
- Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes FE, Dal Monte AP, Filgueiras CC, Manhães AC Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57Bl/6 mice. *Behavioral Brain Research* 2006; 167: 175-82.
- Abreu-Villaça Y, Seidle FJ, Slotkin TA. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Research*, 2003b; 97: 114-128.
- Abreu-Villaça Y, Seidler F, Slotkin TA. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology*, 2004; 29: 1440–1450.
- Abrous DN et al. Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 3656–3662.
- Adam T, Mitschke S, Streibel T, Baker RR, Zimmermann R. Quantitative Puff-by-Puff-Resolved Characterization of Selected Toxic Compounds in Cigarette Mainstream Smoke. *Chem. Res. Toxicol.* 2006; 19, 511-520.
- Adamson J, Azzopardi D, Errington G, Dickens C, McAughey J, Gaça MD. Assessment of an in vitro whole cigarette smoke exposure system: The Borgwaldt RM20S 8-syringe smoking machine. *Chem Cent J*,2011;5:50.
- Adriani W, Granstrem O, Macri S, Izykenova G, Dambinova S, Laviola G. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 869-878.
- Adriani W, Macri S, Pacifici R, Laviola G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-

administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27: 212-224.

Altman J, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.*, 1990; 301: 365-381.

Araújo JA, Menezes AMB, et al. Diretrizes para Cessação do Tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004; 30 (Supl 2).

Arendt T et al. Loss of neurons in rat basal forebrain projection system after prolonged intake of ethanol. *Brain Res. Bull.*, 1988; 21: 563-570.

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

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

Barron S, White A, Swartzwelder HS, Bell RL, Rodd ZA, Slawecki CJ, Ehlers CL, Levin ED, Rezvani AH, Spear LP. Adolescent vulnerabilities to chronic alcohol or nicotine exposure: findings from rodent models. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*; 2005; 29:1720-5.

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

Bayer SA. [3H] Thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Experimental Brain Research*, 1983; 50: 329-340.

Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, 1982; 216: 890-892.

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

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

Binnie V, Mchugh S, Macpherson L, Borland B, Moir K, Malik K. The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine. *Oral Diseases*; 2004; 10: 287-293.

Blomqvist O, Ericson M, Johnson DH, Engel JA, Soderpalm B. Voluntary ethanol intake in the rat: effects of nicotinic acetylcholine receptor blockade or subchronic nicotine treatment. *European journal of pharmacology*, 1996; 31; 314:257-67.

Blomqvist O, Soderpalm B, Engel JA. Ethanol-induced locomotor activity: involvement of central nicotinic acetylcholine receptors? *Brain Research Bulletin*, 1992; 29: 173-178.

Bobo JK et al. Cigarette smoking cessation attempts by recovering alcoholics. *Addict Behav.* 1987; 12: 209–215.

Britton, A., Marmot, M. G., Shipley, M.. Who benefits most from the cardioprotective properties of alcohol consumption—health freaks or couch potatoes? *Journal of Epidemiology and Community Health*, 2008; 62, 905-908.

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

Burling TA, Ziff DC. Tobacco smoking: a comparison between alcohol and drug abuse inpatients. *Addictive behaviors*, 1988; 13: 185-190.

Butt CM et al. Interaction of the nicotinic cholinergic system with ethanol withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2004; 308: 591–599.

Caraballo RS, Giovino GA, Pechacek TF. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine Tobacco Research*; 2004; 6: 19-25.

Carmelli D, Swan GE, Robinette D. The relationship between quitting smoking and changes in drinking in World War II veteran twins. *J Subst Abuse.*, 1993; 5:103-116.

Carmody TP et al. Co-occurrent use of cigarettes, alcohol, and coffee in healthy, community-living men and women.. *Health psychology*, 1985; 4: 323-335.

Carpenter-Hyland EP, Chandler LJ. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction.. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007; 86: 200-208.

Caspers K, Arndt S, Yucuis R, McKirgan L, Spinks R. Effects of alcohol- and cigarette use disorders on global and specific measures of cognition in middle-age adults. *J Stud Alcohol Drugs.* 2010; 71(2):192-200.

Cavalcante T. Programa Nacional de Controle do Tabagismo. *Avanços e Desafios. CONPREV. Instituto Nacional de Câncer.* 2001

Ceballos NA. Tobacco use, alcohol dependence, and cognitive performance. *Journal of General Psychology*, 2006; 133, 375-388.

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

Centers for Disease Control and Prevention. Tobacco use among high school students — United States, 1997. *Morbid. Mortal.* 1998. *Wkly. Rpt.* 47: 229-233.

Centers for Disease Control and Prevention. Trends in cigarette smoking among high school students: United States, 1991-1999. *Morbid. Mortal.* 2000. *Wkly. Rpt.* 49: 755-758.

Centers for Disease Control and Prevention Annual smoking-attributable mortality, years of

potential life lost, and economic costs-United States, 1995-1999. *Morbid. Mort. Wkly.* 2002. Rpt . 51.

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

Chen K, Kandel DB. The natural history of drug use from adolescence to the mid-thirties in a general population sample. *American Journal of Public Health*, 1995; 85: 41-47.

Chen WJ, Harle LK. Interactive effect of alcohol and nicotine on developing cerebellum: an investigation of the temporal pattern of alcohol and nicotine administration.. *Alcohol Clinical Experimental Research*; 2005; 29: 437-442.

CISA - Centro de informações sobre saúde e álcool. 2011. Disponível em:<<http://www.cisa.org.br/categoria.html?FhIdCategoria=a76539daa156490d3e5c5729da36f220>>

Collins AC. Interactions of ethanol and nicotine at the receptor level. *Recent Developments in Alcoholism*; 1990; 8: 221-31.

Collins AC et al. Tolerance to and cross tolerance between ethanol and nicotine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1988; 29: 365-373.

Collins AC, Grady S, Marks M. Ethanol selectivity modulates brain nicotine receptor function. *Alcohol: Clinical experimental research*. 1995; 19: 502.

Collins AC, Wilkins L, Slobe B, Cao J, Bullock A. Long-term ethanol and nicotine treatment elicit tolerance to ethanol. *Alcoholism, clinical and experimental research*; 1996; 20: 990-9.

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

Courtney KE, Polich J. Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants. *Psychol Bull.*, 2009; 135:142-156.

Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 699-729.

Dani JA, Harris RA. Nicotine addiction and comorbidity with alcohol abuse and mental illness. *Nat Neurosci.*, 2005; 8: 1465-1470.

Dani JA, Heinemann S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse.. *Neuron* 16: 1996; 905-908.

Davies, SJ; Pandit, SA; Feeney, A; Stevenson, BJ; Kerwin, RW; Nutt, DJ ... Lingford-Hughes, A. Is there cognitive impairment in clinically 'healthy' abstinent alcohol dependence? *Alcohol and Alcoholism*, 2005; 40, 498-503.

Deng XS, Deitrich RA. Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Curr Drug Abuse Rev.*, 2008; 1:3-8.

Deykin EY, Levy JC, Well V. Adolescent depression, alcohol and drug abuse. *American journal of Public Health*, 1987; 77:178-82.

Di Franza JR, Guerrera MP. Alcoholism and smoking. *Journal of studies on alcohol*, 1990; 51:130-5.

Dickson PA et al. Effects of variation at the ALDH2 locus on alcohol metabolism, sensitivity, consumption, and dependence in Europeans. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2006; 30: 1093–1100.

DiFranza J, 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. *Tobacco Control* 2002a; 11: 228-235.

DiFranza JR, Rigotti NA, McNeill AD, Ockene JK, Savageau JA, St. Cyr D, Coleman M. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tobacco Control* 2000; 9: 313-319.

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.* 2002b; 156: 397-403.

Dinas PC, Koutedakis Y; Flouris AD. Effects of active and passive tobacco cigarette smoking on heart rate variability. *Internacional Journal Of Cardiology*. 2011

Drugs (<http://www.espad.org/espad-reports>, accessed: 28 November 2010).

Dunn AJ, Kramarcy NR. Neurochemical responses in stress: Relationships between the hypothalamic-pituitary-adrenal and catecholamine systems.. In: Iversen, LL; Iversen SD e Snyder SH (Eds) *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 18, New York: Plenum, 1984; pp. 455-515.

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

Eckardt MJ et al. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system.. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1998; 22:998-1040.

El Fakahany E, Mitler R, Abbsee M, El Defrawi A, El Defrawi M. Alcohol modulation of drug binding to the channel sites of nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*; 1983; 224: 289-96.

Elders MJ, Perry CL, Eriksen MP, Giovino GA. The report of the Surgeon General: preventing tobacco use among young people. *Am J Public Health*; 1994; 84(4): 543-547.

Ellman GL, Courtney KD, Anders V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961;7: 88-95.

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* 2007; 9: 1005-1013.

Faraday MM, Elliott BM, Grunberg NE. Adult vs. adolescent rats differ in biobehavioral responses to chronic nicotine administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001;70: 475-489.

Faraday MM, Elliott BM, Phillips JM, Grunberg NE. Adolescent and adult male rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003; 74: 917-931.

Fergusson DM, Lynskey MT, Horwood LJ. Childhood exposure to alcohol and adolescent drinking patterns. *Addiction*, 1994; 89:1007-16, 1994.

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

Finn DA, Crabbe JC. Exploring alcohol withdrawal syndrome. *Alcohol health and research world*; 1997; 21:149-56.

Floyd EA et al. Chronic ethanol ingestion produces cholinergic hypofunction in rat brain. *Alcohol*, 1997; 14: 93-98.

Fox, AM; Coltheart, M; Solowij, N; Michie, PT; & Fox, GA. Dissociable cognitive impairments in problem drinkers. *Alcohol and Alcoholism*, 2000; 35, 52-54.

Friend KB, Pagano ME. Smoking cessation and alcohol consumption in individuals in treatment for alcohol use disorders. *J Addict Dis.*, 2005; 24: 61-75.

Funk D, Marinelli PW, Lê AD. Biological processes underlying co-use of alcohol and nicotine: neuronal mechanisms, cross-tolerance, and genetic factors.. *Alcohol Res Health.*, 2006; 29:186-192.

Galduróz JC, Noto AR, Nappo SA, Carlini EA. Use of psychotropic drugs in Brazil: household survey in the 107 biggest Brazilian cities. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2005.

Garcia Martins RH, Marques Madeira SL, Fabro AT, Souza Rocha ND, Oliveira Semenzati GD, Alves KF. Effects to exposure of tobacco smoke and alcohol on the tongue and pharynx of rats. *Inhal Toxicol.* 2012.

Gilbert DG, Robinson JH, Chamberlin CL, Spielberger CD. Effects of smoking/nicotine on anxiety, heart rate, and lateralization of EEG during a stressful movie. *Psychophysiology*; 1989; 26: 311-320.

Gilbertson RJ, Barron S. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*; 2005;81: 54-64.

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

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

Glass, J. M., Buu, A., Adams, K. M., Nigg, J. T., Puttler, L. I., Jester, J. M., & Zucker, R. A.. Effects of alcoholism severity and smoking on executive neurocognitive function.. *Addiction*, 2009; 104, 38-48.

Goeders NE. A neuroendocrine role in cocaine reinforcement.. *Psychoneuroendocrinology*, 1997; 22: 237-59.

Grant BF. Age at smoking onset and its association with alcohol consumption and DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Subst Abuse*. 1998; 10(1):59-73.

Grant BF, Harford TC, Grigson MB. Stability of alcohol consumption among youth: A national longitudinal study. *Journal of Studies on Alcohol*, 1987; 49: 253-260.

Grant, K. A.. "Emerging neurochemical concepts in the actions of ethanol at ligand-gated ion channels." *Behav. Pharmacol.* 1994; 5: 383-404.

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

Happe HK, Murrin LC. High-affinity choline transport regulation by drug administration during postnatal development. *J. Neurochem.* 1992; 58: 2053-2059.

Harris RA. Ethanol actions on multiple ion channels: which are important?. *Alcoholism, clinical and experimental research*; 1999; 23:1563-70.

Hawkins JD et al. Exploring the effects of age of alcohol use initiation and psychosocial risk factors on subsequent alcohol misuse. *Journal of studies on alcohol*, 1997; 58:280-90.

Heffernan T., Clark R., Bartholomew J., Ling J., Sstephens. Does binge drinking in teenagers affect their everyday prospective memory?. *Drug and Alcohol Dependence* 109. 2010; 73-78.

Hernandez M, Spear LP. Ethanol-induced analgesia in adolescent and adult rats. Presented at the annual meeting of the International Society for Developmental Psychobiology. 2003.

Hibell B et al. The 2007 ESPAD report: substance use among students in 35 European countries. Stockholm, European School Survey Project on Alcohol and Other. 2009.

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

Hisaoka M, Levy G. Kinetics of drug action in disease states XI: effect of nicotine on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of phenobarbital and ethanol in rats. *Journal Pharmacology Science*; 74: 412-415. 1985.

Hughes J. Clinical Implications of the association between smoking and alcoholism. In: Fertig JB, Allen JP, editors. *Alcohol and tobacco: from basic science to clinical practice*. 1995.

NIAAA Research Monograph n° 3 NIH Publ. n° 95-39-31. Washington (DC): National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism; pp 171-85.

Hughes JR, Rose GL, Callas PW. Do former smokers respond to nicotine differently from never smokers? A pilot study. *Nicotine Tobacco Research*; 2000; 2:255-62.

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

Huttenlocher PR. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia*; 1990; 28: 517-527.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição. 1989.

Izquierdo I. Memória. 2ª Ed – Revista e Ampliada. *Artmed*. 2011.136p.

Jackson KJ et al. Differential role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in physical and affective nicotine withdrawal signs. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2008; 325: 302–312.

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

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

Jamal M, Ameno K, Miki T, Tanaka N, Ohkubo E, Kinoshita H. Effects of systemic nicotine, alcohol or their combination on cholinergic markers in the frontal cortex and hippocampus of rat.. *Neurochem Res.*; 2010; 35(7):1064-70.

Jang MH et al. Nicotine administration decreases nitric oxide synthase expression in the hypothalamus of food-deprived rats. *Neuroscience Letters*, 2002; 322: 29-32.

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

Johnson RD et al. Cigarette smoking and rate of gastric emptying: effect on alcohol absorption. *BMJ.*, 1991; 302: 20–23.

Kalmijn, S; Van Boxtel, MP; Verschuren, M. W; Jolles, J; & Launer, LJ. Cigarette smoking and alcohol consumption in relation to cognitive performance in middle age. *American Journal of Epidemiology*, 2002; 156, 936-944.

Kandel DB, Logan JA. Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: I. Periods of risk for initiation, continued use, and discontinuation. *American Journal of Public Health*, 1984; 74: 660-6.

Kandel DB, Yamaguchi K, Chen K. Stages of progression in drug involvement from adolescence to adulthood: further evidence for the gateway theory. *J Stud Alcohol*, 1992; 53:447-457.

Kassel JD, Unrod M. Smoking, anxiety, and attention: support for the role of nicotine in attentionally mediated anxiety. *Journal of abnormal psychology*; 2000; 109:161-6.

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

Kendig MD, Bowen MT, Kemp AH, McGregor IS. Predatory threat induces huddling in adolescent rats and residual changes in early adulthood suggestive of increased resilience. *Behav Brain Res.*; 2011; 225(2):405-14.

Klemm N, Kuhar MJ. Post-mortem changes in high affinity choline uptake. *J Neurochem* 1979; 32: 1487-1494.

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

Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in pharmacological Sciences*, 1992; 13: 177-84.

Koszowski B, Goniewicz ML, Czogala J, Zymelka A, Sobczak A. Simultaneous determination of nicotine and 3-vinylpyridine in single cigarette tobacco smoke and in indoor air using direct extraction to solid phase. *Int J Environ Anal Chem.*: 2009;105-117.

Kraus L, Metzner C, Piontek D. Alcopops, alcohol consumption and alcohol related problems in a sample of German adolescents: is there an alcopop-specific effect? *Drug and Alcohol Dependence*, 2010; 110:15–20.

Lallemant F, Ward RJ, De Witte P. Nicotine increases ethanol preference but decreases locomotor activity during the initial stages of chronic ethanol withdrawal. *Alcohol Alcohol*, 2007; 42: 207-218.

Lancet. Calling time on young people's alcohol consumption. 2008. Vol. 371:871 (<http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673608603864/fulltext?rss=yes>).

Landrigan PJ, Schechter CB, Lipton JM, Fahs MC, Schwartz J. Environmental pollutants and costs for lead poisoning, asthma, cancer and developmental disabilities. *Environ. Health Perspect.* 2002; 110: 721-728.

Laranjeiras RR, Pinsky I. *O alcoolismo*. São Paulo: Contexto. 1997.

Larsson, A; Engel, JA. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2004; 27: 713-20.

Lasser K, Boyd JM, Woolhandler S, Himmelstein DU, McCormic D, Bor DH. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. *The journal of American medical association*; 2000; 284: 2606-10.

Lê AD, Corrigan WA, Harding JW, Juzysch W, Li TK. Involvement of nicotinic receptors in alcohol self-administration. *Alcohol Clinical Exp Research*; 2000; 24: 155-163.

Leone A. Biochemical markers of cardiovascular damage from tobacco smoke. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 2199-208.

Leroi, I., Sheppard, J. M., & Lyketsos, C. G.. Cognitive function after 11.5 years of alcohol use: Relation to alcohol use. *American Journal of Epidemiology*, 2002; 156, 747-752.

Leslie FM, Loughlin SE, Wang R, Perez L, Lotfipour S, Belluzia JD. Adolescent development of forebrain stimulant responsiveness: insights from animal studies. *Ann N Y Acad Sci* 1021. 2004.

Levin ED. Persisting effects of chronic adolescent nicotine administration on radial-arm maze learning and response to nicotinic challenges. *Neurotoxicol. Teratol. Neurobehavioral Teratology Society abstracts* 1999; 21: 338.

Levin ED, Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of nicotine. In: Slikker, W., Chang, L.W. (Eds.). *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Academic Press, San Diego, 1998; pp. 587-615.

Little HJ. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol research & health. The journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 2000; 24: 215-224.

Little PJ, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS. Differential effects of ethanol in adolescent and adults rats. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*; 1996; 20: 1346-51.

Lopez MF, White NM, Randall CL. Alcohol tolerance and nicotine cross-tolerance in adolescent mice. *Addict Biol.*, 2001; 6: 119-127.

Lovinger DM. 5-HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. *Neurochem Int.*, 1999; 35: 125-130.

Maggs JL, Patrick ME, Feinstein L. Childhood and adolescent predictors of alcohol use and problems in adolescence and adulthood in the National Child Development Study. *Addiction*, 2008; 103: 7-22.

Manhães AC et al. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.*, 2008; 193:216-224.

Markwiese, BJ; Acheson, SK; Levin, ED; Wilson, WA and Swartzwelder, HS. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1998; 22, 416-421.

Martins RHG, Madeira SLM, Fabro AT, Rocha NDS, Semenzati GDO, Alves KF. Effects to exposure of tobacco smoke and alcohol on the tongue and pharynx of rats. *Inhal Toxicol.* 2012.

Matthews DA et al. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. Histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity. *Developmental Biology*, 1974. 36: 130-141.

Matthews DA, Nadler JV, Lynch GS, Cotman CW. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. *Dev. Biol.* 36: 130-141

Mc Williams JR, Lynch G (1983). Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science*; 1974; 221: 572-574.

McAllister I. Alcohol consumption among adolescents and young adults. Melbourne, Victoria, Report commission by the Distilled Spirits Industries Council of Australia. 2003.

McGinnis JM, Foege WH. Actual causes of death in the United States. *JAMA*, 270: 1993. 2207-2212.

McGuire, L. C., Ajani, U. A., & Ford, E. S.. Cognitive functioning in late life: The impact of moderate alcohol consumption. *Annals of Epidemiology*, 2007.17, 93-99.

Mendrek A, Monterosso J, Simon SL, Jarvik M, Brody A, Olmstead R, Domier CP, Cohen MS, Ernst M, London ED. Working memory in cigarette smokers: comparison to non-smokers and effects of abstinence. *Addict Behav.* 2006.;31(5):833-44.

Mendrek A., Monterosso J., Simon SL, Jarvik M., Brody A., Olmstead R., Domier C.P., Cohen M.S., Ernst M., London E.D.. Working memory in cigarette smokers: Comparison to non-smokers and effects of abstinence. *Addictive Behaviors*. 2005. Volume 31, 833–844.

Metten P AND Crabbe JC. Dependence and withdraw. In Deitrich RA, Erwin VG, editors. *Pharmacological effects of ethanol on the nervous system*. Boca Raton (FL): CRC press; 1996. p. 269-91.

Miller NS, Gold MS. Comorbid cigarette and alcohol addiction: epidemiology and treatment. *J Addict Dis.*, 1998.17: 55-66.

Ministério da saúde. Vigitel Brasil. Saúde suplementar vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11461. 2009.

Ministério da saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarNoticia&codConteudo=2143&codModuloArea=162&chamada=adolescentes-tem-facil-acesso-ao-cigarro>. 2011.

MMWR. Smoking during pregnancy-United States. 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly REP* 53: 911-915. 1990-2002.

Moreira LB et al.. Alcoholic beverage consumption and associated factors in Porto Alegre, a southern Brazilian city: a population-based survey. *Journal of Studies on Alcoholism*, 1996. 57: 253-259.

Morissette SB, Tull MT, Gulliver SB, Kamholz BW, Zimering RT. Anxiety, anxiety disorders, tobacco use, and nicotine: a critical review of interrelationships. *Psychology Bulletin*; 2007.133:245-72.

Moy SS, Duncan GE, Knapp DJ, Breese GR. Sensitivity to ethanol across development in rats: comparison to [3H] zolpidem binding. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*; 1998.22:1485-1492.

Nadler JV et al. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. II. Quantitative changes in choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Development Biology*, 1974.36: 142-154.

Nadler JV, Matthews DA, Cotman CW, Lynch GS. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. II. Quantitative changes in choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities. *Dev. Biol.* 1974.36: 142-154.

National Institute on Drug Abuse. Nicotine Addiction. NIH Publication Number 98-4342, NIH Publication Number 1998.98-4342.

Nelson DA et al. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *American Journal of Public Health*, 1995. 85:34-40.

Nelson DA et al. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *American Journal of Public Health*, 1995.85:34-40.

Nowak A et al. Cigarette smoking delays gastric emptying of a radiolabelled solid food in healthy smokers. *Scand J Gastroenterol*, 1987.22: 54-58.

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; 123(1):144-54.

Oliveira-da-Silva A et al. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int J Dev Neurosci*. 2009.

O'Loughlin J, Kishchuk N, DiFranza J, Tremblay M, Paradis G. The hardest thing is the habit: a qualitative investigation of adolescent smokers' experience of nicotine dependence. *Nicotine Tobacco Res.* 4.2002: 201-209.

Organização panamericana de saúde – OPS. Banco mundial (BM) – La epidemia del tabaquismo. Publicación científica N° 577. 2000.

- Parnell SE, West JR, Chen WJ. Nicotine decreases blood alcohol concentrations in adult rats: a phenomenon potentially related to gastric function. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2006.30:1408-1413.
- Parnell SE, West JR, Chen WJ. Nicotine decreases blood alcohol concentrations in adult rats: a phenomenon potentially related to gastric function. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2006.30:1408-1413.
- Parrot AC. Cigarette-derived nicotine is not a medicine. *World Journal of Biology Psychiatry*; 2003.4: 49-55.
- Parsons OA, Nixon SJ. Cognitive functioning in sober social drinkers: a review of the research since 1986. *J Stud Alcohol*; 1986.59: 180-190.
- Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pense/default.shtm>. 2009.
- Piazza PV, Rouge-Pont F, Deminiere JM, Kharoubi M, Lemoal M e Simon H. Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine selfadministration. *Brain Research*; 1991.567: 169-74.
- Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport* 2002.; 13:1097-106.
- Pierce JP, Gilpin E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *Am. J. Pub. Health* 1996. 86: 253-256.
- Pomerleau OF. Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. *Psychopharmacology Bulletin*, 1986; 22: 865-869.
- Popovic M, Caballero-Bleda M, Puelles L, Guerri C. Multiple binge alcohol consumption during rat adolescence increases anxiety but does not impair retention in the passive avoidance task. *Neurosci. Lett*; 2004.357: 79-82.
- Prescott CA, Kendler KS. Age at first drink and risk for alcoholism: a noncausal association. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1999.23:101-7.
- Prokhorov A.V., Winickoff J.P., Ahluwalia J.S., Ossip-Klein D., Tanski S., Lando H. A., et al.. Tobacco Consortium, American Academy of Pediatrics Center for Child Health Research. Youth tobacco use: A global perspective for child health care clinicians. *Pediatrics*, 2006. 118, e890–e903.
- Quertemont E, Tambour S, Tirelli E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: A comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol.*, 2005. 75:247–274.
- Rezvani AH, Levin ED. Nicotine-alcohol interactions and cognitive function in rats. *Pharmacology, biochemistry and behaviour*, 2002. 72: 865-872.

- Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Nicotine and ethanol interact during adolescence: effects on the central cholinergic systems. *Brain Res.* 2008; 1232: 48-60.
- Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Medeiros AH, Siqueira NR, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience* ; 2009; 162(4):1174-86.
- 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.*; 2011; 221(1):282-9.
- Rinaldi M, Maes K, De Vleeschauwer S, Thomas D, Verbeken EK, Decramer M, Janssens W, Gayan-Ramirez GN. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice. *Dis Model Mech.* 2012.
- Ristuccia R.C., Spear L.P. Autonomic responses to ethanol in adolescent and adult rats: a dose-response analysis. *Alcohol* 2008; 42, 623–629.
- Roelofs SM. Hyperventilation, anxiety, craving for alcohol: a subacute alcohol withdrawal syndrome. *Alcohol.* Fayetteville, N.Y. 1985.;2:501-5.
- Rosemberg J., Rosemberg A.M.A., Moraes M.A.. *Nicotina Droga Universal (Atualizada e ampliada)*. São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. INCA. 2005.239 p.
- Royal College of Physicians Nicotine Addiction in Britain, A report of the Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians. Royal College of Physicians of London, Royal College of Physicians of London. 2000.
- Scheetz AJ, Constantine-Paton M. Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J.* 1994. 8: 745-752.
- Schepis TS, Adinoff B, Rao U. Neurobiological processes in adolescent addictive disorders. *Am J Addict.*, 2008; 17: 6-23.
- Schinka J.A., Vanderploeg R.D., Rogish M, Ordorica P.I.. Effects of alcohol and cigarette use on cognition in middle-aged adults. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 2002; 8, 683-690.
- Schneider S, Schütz J. Who smokes during pregnancy? A systematic literature review of population-based surveys conducted in developed countries between 1997 and 200. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2008; 13: 138-147.
- Schochet TL, Kelley AE, Landry CF. Differential behavioral effects of nicotine exposure in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology* 2004; 175: 265-73.
- Schorling JB et al. Tobacco, alcohol and other drug use among college students. *J. Subst. Abuse.* 1994; 6: 105–115.

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

Schweinsburg A.D., Schweinsburg B.C., Cheung E.H., Brouwn G.G., Brown S.A., Tapert S.F.. fMRI response to spatial working memory in adolescents with comorbid marijuana and alcohol use disorders.. *Drug Alcohol Depend.* 2005; 79, 201-207.

Scott AM et al. Effects of cigarette smoking on solid and liquid intragastric distribution and gastric emptying. *Gastroenterology*, 1993; 104: 410-416.

Silveri MM, Spear LP. Decreased sensitivity to the hypnotic effects of ethanol early in ontogeny. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*; 1998; 22: 670-6.

Silveri MM, Spear LP. Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol*; 2000; 20: 45-53.

Simon JR, Atweh S, Kuhar. Sodium-dependent high affinity choline uptake: a regulatory step in the synthesis of acetylcholine. *J Neurochem.* 1976; 26:909-922.

Singer MV, Feick P, Gerloff A. Alcohol and smoking. 2011. *Dig Dis.*29(2):177-83.

Sircar R, Sircar D. Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. *Alcohol Clin Exp Res*; 2005; 29: 1402-1410.

Slawecki CJ, Ehlers CL. Lasting effects of adolescent nicotine exposure on the electroencephalogram, event related potentials, and locomotor activity in the rat. *Brain Research.. Developmental Brain Research*; 2002; 138:15-25.

Slawecki CJ, Roth J. Comparison of the onset of hypoactivity and anxiety-like behavior during alcohol withdrawal in adolescent and adult rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*; 2004; 28:598-607.

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

Slotkin TA. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol. Teratol.* 2002; 24: 369-384.

Slotkin TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004; 198: 132-151.

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

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 signaling in brain and heart of neonatal rats. *Brain Res.* 2001; 898: 73-81

Slotkin, TA. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. 2002. *Neurotoxicology Teratology*, 2002; 24: 369-384.

Smith BR, Horan JT, Gaskin S, Amit Z. Exposure to nicotine enhances acquisition of ethanol drinking by laboratory rats in a limited access paradigm. *Pharmacology (Berlin)*; 1999; 142:408-12.

Smith LN, McDonald CG, Bergstrom HC, Brielmaier JM, Eppolito AK, Wheeler TL, Falco AM, Smith RF. Long-term changes in fear conditioning and anxiety-like behavior following nicotine exposure in adult versus adolescent rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 85: 91-7.

Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2000;24: 417-63.

Spear LP, Brake SC. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev. Psychobiol.* 1983;16: 83-109.

Spear LP, Varlinskaya IE. Adolescence. Alcohol sensitivity, tolerance, and intake. Recent developments in alcoholism: an official publication of the American Medical Society on alcoholism, Research Society on Alcoholism and the Nacional Council on Alcoholism; 2005; 17:143-59.

Tapert S.F., Brown S.A.. Substance dependence, family history of alcohol dependence and neuropsychological functioning in adolescence. *Addiction* 2000; 95, 1043-1053.

Tapert S.F., Granholm E., Leedy N.G., Brown S.A.. Substance use and withdrawal: neuropsychological functioning over 8 years in youth. *J.Int.Neuropsychol.* 2002; 8, 873-883.

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

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

Torabi MR, Bailey, WJ, Majd-Jabbari, M. Cigarette smoking as a predictor of alcohol and other drug use by children and adolescents: evidence of the 'Gateway Drug Effect'. *J. Sch. Health*, 1993; 63: 302-306.

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

Trauth JA et al. Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions. *Brain research*, 1999; 851: 9-19.

Trauth JA, McCook EC, Seidler FJ, Slotkin TA. Modeling adolescent nicotine exposure: effects on cholinergic systems in rat brain regions. *Brain Res.* 2000a; 873: 18-25.

Trauth JA, Seidler FJ, Ali SF, Slotkin TA. Adolescent nicotine exposure produces immediate and long-term changes in CNS noradrenergic and dopaminergic function. *Brain Res.* 2001; 892: 269-280.

Trauth JA, Seidler FJ, Slotkin TA. Persistent and delayed behavioral changes after nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res.* 2000b; 880: 167-172.

Tsukada H, Miyasato K, Nishiyama S, Fukumoto D, Kakiuchi T, Domino EF. Nicotine normalizes increased prefrontal cortical dopamine D1 receptor binding and decreased working memory performance produced by repeated pretreatment with MK-801: a pet study in conscious monkeys. *Neuropsychopharmacology*; 2005; 30, 2144-2153.

Tsuy T, Lê AD, Wang A, Juzytsch W, Harding S. Exposure to nicotine but not alcohol during adolescence enhances acquisition of alcohol consumption in adulthood. *Alcoholism, clinical and experimental research*; 25. 2001.

Tugay M et al. Impaired gastric motility in the gastroesophageal reflux rat model: an in vitro study. *J Surg Res.*, 2003; 115: 272-278.

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

Varlinskaya EI, Spear LP. Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adults rats: Role of familiarity of the test situation. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*; 2002; 26:1502-1511.

Vastola BJ, Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP. Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rat. *Physiology & Behavior* 2002; 77: 107-114.

Webster RA, Hunter M, Keats JA. Peer and parental influences on adolescents' substance use: a path analysis. *The international journal of the Addictions*, 1994; 29: 647-57.

White AM, Ghia AJ, Levin ED, Swartzwelder HS. Binge pattern ethanol exposure in adolescent and adult rats: differential impact on subsequent responsiveness to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.*; 2000; 24: 1251-6.

White AM, Truesdale MC, Bae JG, Ahmad S, Wilson WA, Best PJ, Swartzwelder HS. Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*; 2002; 73:673-7.

White AM, Swartzwelder HS. Age-related effects of alcohol on memory and memory-related brain function in adolescents and adults. *Recent Dev Alcohol*; 2005; 17: 161-176.

WHO. Tobacco or Health: A Global Status Report, World Health Organization: Geneva. 1997.

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

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

Wood T, Wewers ME, Groner J, Ahijevych K. Smoke constituent exposure and smoking topography of adolescent daily cigarette smokers. *Nicotine Tobacco Research*; 2004; 6: 853-862.

World health organization. Convenção quadro de controle do tabaco. Dia Mundial Sem Tabaco. 2004. Tabaco e Pobreza – Um Círculo Vicioso. 2004.

World Health Organization. WHO Expert Committee on Problems Related to Alcohol Consumption. Second report. Geneva (WHO Technical Report Series, No. 944). 2007.

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

World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic. Warning about the dangers of tobacco. (2011)b.

Yoshida K, Engel J, Liljequist S. The effect of chronic ethanol administration of high affinity 3H-nicotinic binding in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Archives of pharmacology*; 1982; 321:74-6

Yttri EA, Burk JÁ, Hunt PS. Intermittent ethanol exposure in adolescent rats: dosedependent impairments in trace conditioning. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*; 2004; 28:1433-6.

Zahalka E, Seidler FJ, Lappi SE, Yanai J, Slotkin TA. Differential development of cholinergic nerve terminal markers in rat brain regions: Implications for nerve terminal density, impulse activity and specific gene expression. *Brain Res.* 1993; 601: 221-229.

Zahalka E, Seidler FJ, Lappi SE, Yanai J, Slotkin TA. Differential development of cholinergic nerve terminal markers in rat brain regions: Implications for nerve terminal density, impulse activity and specific gene expression. *Brain Res.* 1993; 601: 221-229.

Zahalka EA, Seidler FJ, Lappi SE, McCook EC, Yanai J, Slotkin TA. Deficits in development of central cholinergic pathways caused by fetal nicotine exposure: differential effects on choline acetyltransferase activity and [3H]hemicholinium-3 binding. *Neurotoxicol. Teratol.* 1992;14: 375-382.

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