



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

Vinícius Moraes de Souza Guimarães

**Curso temporal dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro e/ou etanol
durante a adolescência no sistema serotoninérgico cerebral em
camundongos suíços**

Rio de Janeiro

2018

Vinícius Moraes de Souza Guimarães

Curso temporal dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro e/ou etanol durante a adolescência no sistema serotoninérgico cerebral em camundongos suíços

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 Abreu Villaça
Coorientador : Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho

Rio de Janeiro

2018

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

G963 Guimarães, Vinícius Moraes de Souza.
Curso temporal dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro e/ou etanol durante a adolescência no sistema serotoninérgico cerebral em camundongos suíços/ Vinícius Moraes de Souza Guimarães. - 2018.
63 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça
Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho

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

1. Tabaco – Teses. 2. Etanol – Teses. 3. Adolescência – Álcool - Teses. 4. Serotonina – Teses. I. Villaça, Yael de Abreu. II. Carvalho, Anderson Ribeiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 613.81-053.6

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Vinícius Moraes de Souza Guimarães

Curso temporal dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro e/ou etanol durante a adolescência no sistema serotoninérgico cerebral em camundongos suíços

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 20 de Fevereiro de 2018.

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho

Faculdade de Formação de Professores – UERJ

Banca Examinadora:

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

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Paula Campello Costa Lopes

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que amo.

Em especial àqueles que já se foram.

AGRADECIMENTOS

Meu mais sincero agradecimento:

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Yael de Abreu Villaça por todo apoio, confiança, e conhecimentos a mim proporcionados.

Ao meu co-orientador Prof.^o Dr.^o Anderson Ribeiro Carvalho por todo apoio, conselhos e empenho antes e durante o mestrado.

Ao Dr.^o André Nunes Freitas e a Dr.^a Ana Carolina Tavares pela dedicação e colaboração e esforços no presente trabalho, além da camaradagem. Inclusive pelos anos a menos após tantas bioquímicas.

A contribuição dos Professores Dr.^o Cláudio Carneiro Filgueiras, Dr.^o Alex Christian Manhães, Dr.^o Thomas Krahe.

Ao CNPq pela bolsa concedida, sem a qual a esta tarefa seria impossível.

A todos do laboratório de Neurofisiologia que direta ou indiretamente auxiliaram-me neste trabalho. Em especial: Victor e Bruno pela amizade ali estabelecida.

A toda minha família, sem a qual jamais teria conseguido chegar onde estou. Meu Pai Osvaldo, Minha Mãe Mirian Lucia, meu irmão Mario Lucio, Minha Irmã Viviane, meu Tio Geraldo e sua esposa Alice, meu afilhado Gabriel, minha madrasta Rute, meu padraсто Marcelo e minha sogra Valéria.

A minha amada esposa Rafaela, que aturou todas minhas chatices, me apoiou incondicionalmente, principalmente nos momentos onde me via perdido e desesperançoso, lá estava você.

A todos os meus amigos, que cada um em sua forma acabaram também ajudando-me chegar onde estou. Mas como tenho amigos ciumentos, não nomearei ninguém. Agradeço a todos de mesma forma.

A minha Psicóloga Daiane Martins, que me auxiliou bastante nesta reta final.

Por fim aos camundongos, pois tomamos suas vidas em prol do desenvolvimento científico. Estaremos externamente em dívida com vocês.

Parece que eu era apenas um menino, brincando na praia e me divertindo, ao encontrar uma pedra mais lisa... enquanto o grande oceano da verdade se estendia desconhecido à minha frente.

Isaac Newton

RESUMO

GUIMARÃES, Vinicius Moraes de Souza. **Curso temporal dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro e/ou etanol durante a adolescência no sistema serotoninérgico cerebral em camundongos suíços.** Dissertação (Mestrado em Biocências), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O uso de tabaco e/ou etanol está associado à alterações do humor, principalmente quando este uso ocorre durante a adolescência. Essas alterações podem estar envolvidas na etiologia do abuso e da dependência que tornam a adolescência um período de vulnerabilidade ao uso dessas drogas. Considerando a participação do sistema serotoninérgico nos mecanismos fisiológicos que regem os estados emocionais, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações promovidas pela exposição à fumaça de cigarro e/ou etanol sobre o sistema serotoninérgico cerebral de camundongos adolescentes. Para isso, camundongos adolescentes Suíços foram expostos a fumaça de cigarro e/ou ao etanol do 30º ao 45º dia pós-natal (PN), originando assim 4 grupos experimentais: SMK+ETOH (exposição a fumaça de cigarro e injeções i.p. de etanol); SMK (exposição a fumaça de cigarro e injeções salina i.p.); ETOH (exposição a ar corrente e injeções i.p. de etanol); VEH (exposição a ar corrente e injeções salina i.p.). O sistema serotoninérgico foi avaliado no córtex cerebral e hipocampo ao final do período de exposição (PN45), após um curto período de retirada (PN50) e após um longo período de retirada (PN75). Foram utilizados para marcação os seguintes radioligantes: [³H] 8-OH-DPAT, que se liga seletivamente ao receptor serotoninérgico 5HT1A; [³H] Ketanserina, que se liga seletivamente ao receptor 5HT2; [³H] Paroxetina, que se liga seletivamente o transportador pré-sináptico serotoninérgico 5HTT. De forma geral, os marcadores serotoninérgicos foram mais afetados durante a retirada. Em PN45, apenas o hipocampo dos machos apresentou alterações na ligação de 5HTT, os animais SMK apresentaram maior ligação e os animais ETOH apresentaram redução. Neste caso, a coexposição anulou esses efeitos. Após curto período de retirada, animais SMK fêmeas foram mais susceptíveis que os machos, apresentando redução na marcação do 5HT1A no córtex cerebral e de 5HTT no córtex cerebral e hipocampo. Animais expostos ao etanol também apresentaram redução na marcação do 5HT1A em ambos os sexos no hipocampo e apenas em machos no córtex cerebral. Quanto ao 5HTT, animais ETOH apresentaram redução da marcação, em ambos os sexos no córtex cerebral e somente em fêmeas no hipocampo. Nos animais coexpostos houve uma consistente redução da marcação do 5HT1A e do 5HTT. Após longo período de retirada da fumaça de cigarro, foi observado um aumento da marcação de 5HT1A e 5HT2 no córtex cerebral. A coexposição com etanol reverteu este efeito sobre o 5HT1A. O presente trabalho fornece evidências experimentais que indicam que a fumaça de cigarro e o etanol geram consequências na função serotoninérgica durante a adolescência e interagem entre si resultando em alterações diferenciadas entre a vigência da exposição e após a retirada das drogas.

Palavras-chave: Tabaco. Alcool. Adolescencia. Humor. Serotonina.

ABSTRACT

GUIMARÃES, Vinicius Moraes de Souza. **Time course of the effects of exposure to cigarette smoke and/or ethanol during adolescence on the brain serotonergic system in swiss mice.** Dissertação (Mestrado em Biocências), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The use of tobacco and / or ethanol is associated with mood changes, especially when this use occurs during adolescence. These alterations may be involved in the etiology of abuse and dependence that makes adolescence a period of vulnerability to these drugs. Considering the participation of the serotonergic systems in the physiological mechanisms that modulate emotional states, the objectives of this study were to evaluate the changes promoted by cigarette smoke and / or ethanol exposure in the cerebral serotonergic system of adolescent mice. For this, Swiss adolescent mice were exposed to cigarette smoke and / or ethanol from the 30th to the 45th postnatal day (PN), as follows: SMK + ETOH (exposure to cigarette smoke and i.p. ethanol); SMK (exposure to cigarette smoke and i.p. saline); ETOH (exposure to air and i.p. ethanol); (VEH (exposure to air and saline i.p.). The serotonergic system was evaluated in the cerebral cortex and hippocampus at the end of the period of exposure (PN45), during a short-term (PN50) and long-term (PN75) withdrawal. The following biomarkers were used for radioligand labeling: [³H] 8-OH-DPAT, which selectively binds to the serotonergic 5HT1A receptor; [³H] Ketanserin, which selectively binds to the 5HT2 receptor; and [³H] Paroxetine, which selectively binds to the 5HTT serotonergic transporter. In general, serotonergic markers were more affected during withdrawal. On PN45, only the hippocampus of males showed alterations in 5HTT binding: SMK animals showed increased binding and ETOH animals presented reduction. In this case, co-exposure nullified these effects. During the short-term withdrawal, female SMK animals were more susceptible than males, presenting reduction in the 5HT1A marking in the cerebral cortex and 5HTT in the cerebral cortex and hippocampus. Animals exposed to ethanol also showed a reduction in 5HT1A binding in both sexes in the hippocampus and only in males in the cerebral cortex. ETOH animals showed reduction of 5HTT binding in both sexes in the cerebral cortex and only in females in the hippocampus. In the co-exposed animals, there was a consistent reduction of 5HT1A and 5HTT. After a long period of cigarette smoke withdrawal, an increase in the labeling of 5HT1A and 5HT2 in the cerebral cortex was observed. Co-exposure to ethanol reversed this effect on 5HT1A. The present work provides experimental evidence that cigarette smoke and ethanol modify the serotonergic function during adolescence and interact with each other resulting in different alterations during exposure and withdrawal.

Keywords: Tobacco. Alcohol. Adolescence. Mood. Serotonin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Máquina de cigarros.....	27
Figura 2 –	Linha temporal desde o nascimento, desmame, período de exposição e períodos de retirada.....	28
Figura 3 –	Avaliação dos biomarcadores serotoninérgicos em PN45 no córtex cerebral.....	31
Figura 4 –	Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A pelo [³ H] 8-OH- DPAT ao final período de exposição no hipocampo.....	32
Figura 5 –	Marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 pela [³ H] Ketanserina ao final período de exposição no hipocampo.....	33
Figura 6 –	Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A pelo [³ H] 8-OH- DPAT após curto período de retirada (PN50).....	34
Figura 7 –	Marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 pela [³ H] Ketanserina após curto período de retirada (PN50).....	35
Figura 8 –	Marcação do transportador serotoninérgico 5HTT pela [³ H] Paroxetina no córtex cerebral em PN 50.....	35
Figura 9 –	Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A pelo [³ H] 8-OH- DPAT no hipocampo após curto período de retirada das drogas.....	36
Figura 10 –	Marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 pela [³ H] Ketanserina após curto período de retirada.....	37
Figura 11 –	Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A pelo [³ H] 8-OH- DPAT no córtex cerebral em PN 75.....	38
Figura 12 –	Marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 pela [³ H] Ketanserina no córtex cerebral em PN 75.....	38
Figura 13 –	Marcação do transportador serotoninérgico 5HTT pela [³ H] Paroxetina no córtex cerebral em PN 75.....	39
Figura 14 –	Avaliação dos biomarcadores serotoninérgicos após longo período de retirada (PN75) no hipocampo.....	40
Tabela 1 -	Resumo dos resultados.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5HT1A	Receptor serotoninérgico 1A
5HT2	Receptor serotoninérgico 2
5HTT	Transportador pre-sináptico serotoninérgico
ANOVA	Análise de Variância
CEUA	Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais
CX	Cortex cerebral
ETOH	grupo de animais expostos ao etanol
F	razão de Fischer
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FPLSD	<i>Fisher Protected Least Significant Difference</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HP	Hipocampo
i.p.	intraperitoneal
nAChR	receptor nicotínico da acetilcolina
NMDA	N-metil D-aspartato
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Valor de prova
PN	dia de vida pós-natal
rANOVA	Análise de Variância com medidas repetidas
SMK	grupo de animais expostos à fumaça de cigarro
SMK+ETOH	grupo de animais expostos simultaneamente à fumaça de cigarro e ao etanol
VEH	grupo controle

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcetagem
±	Mais ou menos
g	Gramas
mg	Miligramas
µg	Microgramas
µM	Micromolar
nM	Nanomolar
fmol	Femto mol
>	Maior que
<	Menor que

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVOS	25
1.1	Específicos	25
2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	Formação dos grupos experimentais	26
2.2	Escolha das regiões estudadas e descrição da dissecação	28
2.3	Medidas bioquímicas	28
2.4	Análise estatística	30
3	RESULTADOS	31
3.1	Durante o período de exposição as drogas	31
3.1.1	<u>Cortex cerebral</u>	31
3.1.2	<u>Hipocampo</u>	32
3.2	Após curto período de retirada (PN50)	33
3.2.1	<u>Cortex cerebral</u>	33
3.2.2	<u>Hipocampo</u>	36
3.3	Após longo período de retirada (PN75)	37
3.3.1	<u>Cortex cerebral</u>	37
3.3.2	<u>Hipocampo</u>	39
4	DISCUSSÃO	41
4.1	Resumo dos resultados	41
4.2	Modelo de exposição às drogas	43
4.3	Interpretação dos biomarcadores	43
4.4	Efeito de exposição e abstinência da fumaça de cigarro	45
4.5	Efeito da exposição ao etanol	47
4.6	Efeitos da coexposição	48
	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51

INTRODUÇÃO

Adolescência

A adolescência é um estágio do desenvolvimento caracterizado como um período de transição entre a infância e a vida adulta. As etapas desse processo incluem alterações específicas comportamentais e funcionais, sendo considerada assim um período crítico para o desenvolvimento (Spear, 2000). Contudo os limites temporais dessa transição não são bem definidos. Em humanos esse período, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorre entre 10 e 19 anos de idade (Conti et al, 2005). No entanto, o seu início e término variam entre os indivíduos, de modo que os sinais de adolescência podem ser identificados tão cedo como aos 8 anos de idade e podem estar presentes até 25 anos (Spear, 2000, 2007). Em algumas outras espécies também é difícil caracterizar quando a transição para adolescência começa e quando o indivíduo passa de adolescente a adulto. Em roedores, por exemplo, como ratos e camundongos, essa faixa etária ocorre entre o 20º dia de vida pós-natal (PN20) ao 55º dia pós-natal (PN55) (Lewis, 1997).

Assim, esse período é caracterizado por traços impulsivos, de instabilidade emocional e comportamento de risco, que por vezes estão associados com o aumento de vulnerabilidade para transtornos neuropsiquiátricos, incluindo doenças afetivas e susceptibilidade ao vício. (Patton et al., 2009; Spear, 2000). Durante esta etapa, o rápido desenvolvimento do sistema nervoso central e de outros sistemas interage com o desenvolvimento social, permitindo assim transições importantes para a vida adulta (Viner et al., 2012). Tais características comportamentais observadas durante a adolescência surgem como a necessidade do adolescente explorar novos domínios e estabelecer novas relações durante o processo de independência dos pais, o que pode levar o adolescente a condutas que incluem desobediência aos pais, faltas escolares e uso de substâncias (Spear, 2000, 2002).

O cérebro humano, apesar de sua maior complexidade, é como o cérebro do roedor em relação a vários aspectos de sua morfologia e organização funcional (Molnár et al., 2014, Hevner et al., 2012). Além disso, as características comportamentais, neuroquímicas e morfológicas da adolescência são grandemente conservadas ao longo da evolução, sendo identificadas tanto em seres humanos como em roedores (Semple et al., 2013). Como exemplo, estudos em roedores têm mostrado que adolescentes exibem diferenças quando

comparados com adultos em relação a medidas de ansiedade, depressão e reatividade ao stress (Adriani et al, 2004; Slawewski, 2005). Durante adolescência, roedores apresentam elevados níveis de busca pela novidade (Adriani et al, 1998), impulsividade (Adriani e Laviola, 2003) e comportamento de risco (Macri's et al., 2002), assim como redução da resposta ao estresse (Adriani e Laviola, 2000). Roedores adolescentes exibem aumento no comportamento exploratório e na busca de novidade em relação a ratos em outras idades (Spear, 2000).

O cérebro apresenta uma maior taxa de desenvolvimento na infância e estabiliza-se na idade adulta, sendo desenvolvimento esse pontuado por rápidas transformações neurais durante a adolescência, ou seja, o desenvolvimento do cérebro continua ao longo da adolescência até a vida adulta (Spear, 2000; Galván et al., 2006). Entre alguns eventos do amadurecimento neuronal que ocorrem na adolescência, destacam-se: a remodelação de regiões corticais e subcorticais com mielinização progressiva de axônios e declínio na matéria cinzenta cortical, principalmente devido ao refinamento sináptico (Laviola et al., 2011, Spear, 2013); uma neuroplasticidade mais intensa em comparação com indivíduos adultos, como evidenciado por taxas mais elevadas do remodelamento sináptico mencionado anteriormente, bem como a neurogênese, que é afetada pela experiência, manipulações ambientais e hormônios esteroidais (Spear, 2013); aumento da capacidade de resposta do eixo hipotálamo hipofisário adrenal (HPA) ao estresse (Burke et al., 2014); e um desequilíbrio entre a atividade cortical e subcortical associada a diferenças na taxa de desenvolvimento cerebral, que não é linear em diferentes regiões. Também vale enfatizar o fato de que, durante a adolescência, há um maior nível de atividade neural nas regiões mesolímbicas em resposta a estímulos emocionais, recompensadores e motivacionais que, juntamente com a imaturidade das regiões corticais frontais envolvidas nos processos de controle cognitivo, refletem muito impacto no comportamento (Casey et al., 2011). Como consequência de todos esses fenômenos, pode-se afirmar que o cérebro adolescente é funcionalmente diferente do adulto (Eshel et al, 2007).

Uso e Abuso de drogas na adolescência

As características comportamentais e neurobiológicas inerentes a adolescência sugerem que tais fatores predisõem o adolescente a experimentar drogas (Kandel e Yamaguchi, 1993; Martin et al., 2002). Pode-se afirmar então, que o início do uso de drogas é

conduzido, em parte, por fatores biológicos (Volkow et al., 2009). Visto que o cérebro durante a adolescência encontra-se ainda em desenvolvimento, os adolescentes podem apresentar uma maior propensão para correr riscos, incluindo fumar, beber ou usar outras drogas. Além do fato de que, quanto mais cedo um indivíduo inicia o uso de certas substâncias, maior a probabilidade de desenvolver transtornos associados ao seu uso (Grant e Dawson, 1997; Placzek, 2009). De fato, a adição é uma complexa e progressiva doença cerebral (Volkow et al., 2009), perturbando o funcionamento e a estrutura das áreas do cérebro responsáveis pela tomada de decisões, autocontrole e sobrevivência, incluindo risco, motivação e avaliação de recompensa, busca por prazer, controle de impulsos e inibição, emoção, aprendizagem, memória e controle do estresse (Dackis e O'Brien, 2005; Volkow e Li, 2005).

Além da imaturidade das estruturas cerebrais envolvidas com o estabelecimento da dependência, vários outros fatores podem ajudar a explicar o motivo da alta associação do uso de drogas de abuso e a adolescência. Neste sentido, destacam-se: o padrão de comportamento, a menor intensidade dos efeitos negativos das drogas e maiores efeitos de recompensa. Dois comportamentos envolvidos na iniciação do uso de drogas são: a impulsividade ou um desejo por novidades e experiências excitantes. A intensa busca pela novidade, característica do período da adolescência, tem sido associada a um maior consumo de drogas de abuso (Abreu-Villaça et al., 2006; Spear, 2000). Contudo, em oposição ao fato de apresentarem uma resposta de recompensa mais intensa, os adolescentes são mais susceptíveis aos efeitos deletérios do uso das drogas de abuso (Spear, 2000).

Interessantemente, estudos em humanos têm encontrado forte correlação entre altas taxas de busca por sensações novas e uso de álcool e o tabaco (Zuckerman, 1994). Adicionalmente, a dependência ao álcool e ao tabaco tem sido associada a altos níveis de impulsividade (Mitchell, 1999; Poulos et al., 1998) e mais recentemente a ansiedade (Abreu-Villaça et al., 2008, 2013b). Essas e outras evidências, quando em conjunto, sugerem que a adolescência é um período de vulnerabilidade ao consumo de drogas, principalmente o etanol e o tabaco, e dessa forma, refletem na possibilidade da existência de vias neuroquímicas, particularmente sensíveis durante a adolescência, compartilhadas entre as duas drogas. O desenvolvimento de modelos animais de exposição a drogas de abuso durante a adolescência tem sido extremamente interessante, pois permite a investigação destas questões (Barron et al., 2005).

Tabaco

O uso do tabaco possui alto poder de causar adição, podendo gerar características clínicas de dependência mesmo durante o início de seu uso (DiFranza et al., 2000; O'Loughlin et al., 2003). É também a principal causa de morte evitável e de doenças em países em desenvolvimento, devido ao fato de ser uma das drogas mais consumidas no mundo, pois, estima-se que haja entre 1 e 2 bilhões de fumantes no mundo, totalizando cerca de 7 trilhões e 300 bilhões de cigarros fumados anualmente e que 6 milhões de pessoas morrem no mundo em decorrência da utilização de produtos derivados do tabaco (OPS-BM, 2000; WHO, 2003; OPAS/OMS 2014).

A maioria dos fumantes inicia o hábito de fumar ainda na adolescência (Mansvelder e McGehee, 2002). De acordo com dados da *American Lung Association*, estima-se que nos EUA, por ano, cerca de 3900 crianças fumam seus primeiros cigarros antes de atingirem 18 anos de idade e que cerca de 85% dos fumantes adultos começaram a fumar antes dos 21 anos de idade. Um levantamento realizado no Brasil demonstra uma prevalência de 38% do consumo de cigarro na faixa de 18 a 24 anos (Neto e Cruz, 2003). Este é o período no qual o indivíduo parece ser mais susceptível à dependência pelo cigarro. Adicionalmente, adolescentes já expressam sintomas de dependência ao tabaco após o consumo de apenas alguns cigarros (Di Franza et al., 2000). Em conjunto, estudos mostram que o consumo diário de cigarros é maior em indivíduos que iniciam o hábito na adolescência quando comparados com indivíduos que iniciam o hábito de fumar na idade adulta (Chen e Millar, 1998; Nelson et al., 1995; Pierce e Gilpin, 1996).

Nas folhas do tabaco encontra-se um alcaloide chamado nicotina, que vem sendo descrito como o principal componente ativo da fumaça de cigarro, responsável por uma série de efeitos no sistema nervoso decorrentes de seu consumo (Benowitz, 1992; Dani e Heinemann, 1996). A nicotina é um estimulante do sistema nervoso central, aumenta o estado de alerta e reduz o apetite (Balbadi e Montovani, 2005). É também conhecida por ser 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). É um agonista colinérgico e sabe-se que a exposição à nicotina durante a adolescência desencadeia intensa e persistente supra-regulação 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; Também são observadas alterações da função colinérgica no córtex cerebral e no hipocampo, regiões associadas a funções cognitivas (Abreu-Villaça et al., 2003a, 2003b, 2004a; Trauth et al., 2000a, 2001; Ribeiro-Carvalho et al., 2008).

A ocorrência de sintomas de dependência à nicotina entre os fumantes adolescentes constitui uma importante barreira para a cessação do tabagismo (Kleijan et al., 2012). Um estudo da *Duke University Medical Center* indica que a exposição à nicotina em uma idade precoce pode deixar uma marca duradoura no cérebro, como por exemplo, quando administrada durante a adolescência induz uma resposta neuroquímica no sistema límbico, induzindo um aumento da serotonina extracelular no núcleo accumbens do rato adolescente, o que reforça a ideia de que fumantes que adotam o hábito em uma idade jovem são mais susceptíveis a continuar a fumar (*Duke University Medical Center*, 2003; Shearman et al., 2008). Contudo, no tabaco, além da nicotina, há uma 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 (Adam et al., 2006; Araújo et al., 2004). Essa mistura possui então em torno de 4500 componentes e há evidências que outros componentes além da nicotina desempenham papéis relevantes nos efeitos do tabaco no sistema nervoso central (Abreu-Villaça et al., 2010; Bruijnzeel, 2012; Rose, 2006; Villégier et al., 2010). Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa tem-se dedicado nos últimos anos a descrever as alterações comportamentais e neuroquímicas provocadas pela exposição à fumaça de cigarro, na tentativa de melhor entender quais efeitos são decorrentes da mistura dos componentes da fumaça de cigarro (Abreu-Villaça et al., 2017; 2016; 2015; 2014; 2013a; 2013b).

Álcool

O Etanol, que é um solvente orgânico, é a droga não terapêutica mais consumida no mundo, que em grandes doses pode, além de gerar dependência, exercer efeitos prejudiciais em diversos órgãos e sistemas de quem o consome, como por exemplo, no fígado, sistema cardiovascular, rins e sistema nervoso (McGinnis e Foege, 1993) e é também um potente agente teratogênico (Hannigan e Armant, 2000).

O consumo de álcool é o fator principal da causa de 60 tipos de doenças e está indiretamente relacionada a outras 200. Estima-se, então, 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. Outro dado a se observar é que 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. Vale ressaltar ainda, que além das implicações sobre a saúde, o etanol também está associado com diversas questões sociais graves, como violência, negligência infantil, abuso e ausência no local de trabalho (WHO, 2011b).

Nos Estados Unidos da América, por exemplo, o consumo de etanol é a terceira causa de morte evitável (McGinnis e Foege, 1993). Já no Brasil, apesar da escassez de estudos, estima-se que 10% da população seja dependente do etanol (Laranjeira e Pinsky, 1997; Moreira et al., 1996). Um estudo realizado pelo Centro Brasileiros de informações sobre Drogas Psicotrópicas em 107 cidades com mais de 200 mil habitantes mostrou que aproximadamente 68% da amostra consumiam álcool. Também foi evidenciado que 15,5% das pessoas na faixa de 18 a 24 anos eram dependentes de álcool (Galduróz e Caetano, 2004). Conforme indica um relatório da *Research Society on Alcoholism*, o abuso de álcool entre adolescentes e adultos jovens é um dos grandes problemas da sociedade moderna (Research Society on Alcoholism, 2009).

O consumo de álcool aumenta drasticamente durante a adolescência (Johnston et al., 2009). Estudos realizados nos Estados Unidos mostraram que a prevalência de consumo de álcool na adolescência varia entre 20% e 35% (Donovan et al., 2004). Deste modo, esse consumo observado em adolescentes pode ser devido, em parte, ao fato de sofrerem menos com os efeitos negativos, visto que estudos em roedores, mostram que animais adolescentes são menos sensíveis aos efeitos sedativos, perda de controle motor, do que os adultos (Silveri e Spear, 1998; White et al., 2002). Assim, estudos epidemiológicos sugerem que a idade na qual se inicia o consumo de álcool pode influenciar profundamente na probabilidade de desenvolver transtornos no consumo de substâncias de abuso em momentos futuros (Clark et al., 1998; Duncan et al., 1997). Além disso, o uso do etanol durante a adolescência promove danos cognitivos mais severos e maior dano celular cerebral (Spear, 200; 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 conjunto de diferenças de idade em relação à sensibilidade ao etanol (Spear e Varlinskaya, 2005).

Ao contrário de algumas drogas, o etanol não age sobre um receptor específico. O etanol tem como sítios de ação uma grande variedade de alvos nas membranas celulares,

como também, cascatas de sinalização intracelulares, induzindo assim, efeitos em receptores de neurotransmissores, neuro-hormônios e canais iônicos. Um dos efeitos mais importantes do etanol é sua propriedade de alterar funções dos receptores ionotrópicos (Koob et al., 1998; 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 da acetilcolina nAChRs (Larsson e Engel, 2004; Lovinger, 1999). Desta forma, 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).

Uso combinado de álcool e tabaco

Estudos epidemiológicos demonstram uma forte relação entre o consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas (Dawson, 2000; Grant, 1998; Larsson e Engel, 2004; Meyerhoff et al., 2006). Atentando que essas são as drogas mais consumidas no mundo (Dani e Harris, 2005), diversos estudos têm demonstrado que 80% a 90% dos alcoolistas fumam (Burling e Ziff, 1988; Crowley et al., 1974), que 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 a não fumantes (Di Franza e Guerrero, 1990), além do consumo diário de cigarros por alcoolistas ser maior do que o consumo por fumantes não alcoolistas (Rezvani e Levin, 2002). Logo, a maioria dos indivíduos que sofrem de transtornos do uso de álcool (D. Falk et al., 2006) ou até mesmo aqueles que bebem socialmente são mais propensos a fumar àqueles que não bebem (S.J. Cross et al., 2017). Como já mencionado, o tabagismo aumenta o risco de distúrbios decorrentes do consumo de álcool (B.F. Grant et al., 2004) e esse consumo pode aumentar a necessidade de fumar e a satisfação do tabagismo (King et al., 2005; J.E. Rose et al., 2004).

Os estudos de interação entre nicotina e etanol são de grande complexidade, onde fatores genéticos e psicossociais podem influenciar. Assim, a existência de modelos animais é fundamental para estudar a importância dessas interações, pois permite que o experimentador

controle esses fatores. Diversos estudos têm demonstrado que a exposição à nicotina promove aumento da autoadministração de etanol em animais (Larsson e Engel, 2004; Lé et al. 2000; Smith et al. 1999). Em estudos de intoxicação pelo etanol, foi demonstrado que nicotina atenua o aumento na utilização da glicose no cerebelo de camundongos (Anwer e Dar, 1995), a descoordenação motora (Dar et al., 1994), assim como, reduz o efeito do etanol sobre a memória (Tracy et al., 1999). Além disso, tem sido demonstrada tolerância cruzada entre as drogas visto que a administração crônica do etanol, a qual induz tolerância para vários efeitos do etanol, também confere tolerância para os efeitos de hipotermia e bradicardia gerados pela nicotina em camundongos e vice-versa (De Fiebre e Collins, 1993).

A maior parte dos estudos sobre mecanismos neurais que tentam relacionar a interação entre drogas de abuso, incluindo a nicotina e o etanol, foca seus estudos no funcionamento do sistema mesolímbico dopaminérgico. Observa-se que ambas as drogas podem ativar esse sistema, que se projeta a partir da área do tegumento ventral para o núcleo accumbente, a amígdala, o hipocampo e córtex pré-frontal (Bien e Burge, 1990; Batel et al., 1995). Alguns estudos mostram que o efeito da nicotina e também do etanol sobre o sistema mesolímbico dopaminérgico depende da ativação dos nAChR (Abreu-Villaça et al., 2017). Isso tudo em conjunto indica que uso dessas substâncias é frequentemente relacionado aos supostos efeitos ansiolíticos, potencializando os efeitos de recompensa (Bruijnzeel et al., 2011). Desse modo, As interações entre essas drogas também influenciam a interrupção e o comportamento de recaídas (Weinberger et al., 2013)

Em todo esse contexto é importante mencionar que o uso de ambas as drogas normalmente se inicia durante o período da adolescência (Nelson et al., 1995; Spear, 2000), tendo em vista que o consumo precoce de bebidas alcoólicas aumenta a probabilidade do consumo de outras drogas (Ellickson et al., 2003) e a frequência de alcoolismo é maior quanto menor a idade do adolescente ao começar a fumar (DiFranza e Guerrera, 1990; Grant, 1998), evidenciando, assim, a adolescência como um período de vulnerabilidade. Como exemplo, nos Estados Unidos, a idade média de início do consumo de álcool é de 17,0 anos e de tabaco é de 17,6 anos, com “indicadores iniciais” entre 12-14 anos de idade (NSDUH, 2013). É importante notar que o consumo de álcool durante a adolescência é frequentemente caracterizado por episódios compulsivos. Curiosamente, o co-consumo é uma via de mão dupla: não só os adolescentes fumantes são susceptíveis a serem bebedores compulsivos, assim como os adolescentes que bebem compulsivamente serão provavelmente fumantes (Johnson et al., 2000). Há também consequências a longo prazo da iniciação precoce, uma vez que os adolescentes fumantes e bebedores pesados estão especialmente em risco de

desenvolver o uso perigoso de substâncias mais tarde na adolescência ou no início da vida adulta (Riala et al., 2004).

Apesar de ser comum o co-uso do álcool e tabaco, pouco se sabe sobre os efeitos combinados destas drogas sobre as respostas emocionais em seres humanos (Braun et al., 2012). A grande maioria dos estudos que se concentram no período da adolescência vem analisando a susceptibilidade desta idade para tabaco ou etanol separadamente, sendo então, raros os estudos que investiguem a interação entre essas drogas. A partir dessa perspectiva o laboratório de Neurofisiologia da UERJ vem concentrando seus esforços em uma série de estudos visando identificar os efeitos comportamentais, bioquímicos e morfológicos da exposição combinada a nicotina/tabaco e etanol durante a adolescência, em camundongos. Esforço esse iniciado em 2005, desde então foram estudados os efeitos sobre a ansiedade (Abreu-Villaça et al., 2008, 2013b), aprendizado e memória (Abreu-Villaça et al., 2007, 2013a), neurotoxicidade (Oliveira-da-Silva et al., 2009, 2010) e sistema colinérgico (Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009).

Estudos do Laboratório demonstraram que o etanol induz certa diminuição da ansiedade na adolescência e que a nicotina, por sua vez, pode reverter este efeito. Além disso, o mesmo estudo apontou que o etanol e a nicotina podem interagir após um longo tempo de retirada, na idade adulta promovendo aumento da ansiedade (Abreu-Villaça et al., 2008), o que pode contribuir para recaídas no uso de drogas. Outro estudo observou a interação entre as drogas na regulação da resposta comportamental quando considerado aprendizado e memória. A nicotina e o etanol quando expostos em conjunto promovem danos na memória significativamente maiores que cada droga individualmente (Abreu-Villaça et al., 2007). Já em relação a neurotoxicidade, o etanol promoveu um aumento da morte celular em todas as áreas do hipocampo de camundongos adolescentes, sendo ambas as populações de neurônio e glia afetados, enquanto que a nicotina causa aumento da morte celular em menor intensidade e de forma região-dependente. 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 que na morte celular (Oliveira-da-Silva et al., 2009).

Tendo em vista que a nicotina é um agonista dos nAChRs, e que o etanol interage com receptores ionotrópicos, incluindo os colinérgicos, visou-se o estudo deste sistema, no entendimento das bases neuroquímicas envolvidas no processo de co-uso e co-abuso dessas drogas. Assim, observou-se que a exposição combinada a nicotina e etanol promoveu uma robusta suprarregulação de $\alpha 4\beta 2$ nAChRs no cortex cerebral e mesencéfalo de camundongos adolescentes, destacando o efeito sinérgicos das drogas sobre o mesencéfalo (Abreu-villaça et

al., 2003a; Flores et al., 1992; Happe et al., 1994; Whiting et al., 1987). Considerando então a importância dos circuitos mesencefálicos nos mecanismos de geração de recompensa e dependência (Mansvelder e Mc Gehee, 2002; Dani e De Biasi, 2001; Picciotto et al., 2008), sugeriu-se que se o mesmo ocorresse em adolescentes humanos, o efeito sinérgico poderia facilitar a geração do abuso de ambas as drogas. A partir disto, também observou-se, em camundongos, que a exposição combinada à nicotina e ao etanol promoveu perda da inervação colinérgica a longo prazo e este efeito estava associado a redução da atividade colinérgica (Ribeiro-Carvalho et al., 2008, 2009).

Os resultados descritos acima indicam que a nicotina e o etanol interagem durante a adolescência, causando grande variedade de alterações durante a exposição e após seu término. Contudo, o adolescente fumante é exposto a diversos outros componentes potencialmente neuroativos presentes na fumaça do cigarro além da nicotina. Estes componentes podem interagir com a nicotina e quando o adolescente consome bebidas alcoólicas. Anteposto a isso, recentemente desenvolvemos uma linha de pesquisa em modelos animais com o objetivo de verificar os efeitos da dupla exposição à fumaça do cigarro e etanol durante a adolescência, período este em que o consumo de tabaco e álcool tem início. Nesse sentido, verificou-se através do teste da esQUIVA passiva que os animais expostos à fumaça, etanol e fumaça+etanol apresentam pior performance cognitiva que os animais controle. Além disso, verificou-se que os déficits de memória e aprendizado persistiram durante a retirada das drogas nos machos que foram previamente expostos à fumaça+etanol. Sugerimos então que a combinação entre as drogas causou danos mais intensos que as drogas isoladas e que os machos são mais suscetíveis (Abreu-Villaça et al., 2013a). Dando continuidade a essa linha de pesquisa, investigamos o comportamento associado à ansiedade em camundongos expostos a fumaça de cigarros, ao etanol ou a ambas as drogas durante a adolescência (Abreu-Villaça et al., 2013b). Tendo em vista a forte associação entre desordens do humor e o sistema serotoninérgico, os resultados encontrados serão descritos no próximo tópico.

Sistema Serotoninérgico: Drogas e Desordens de Humor

A serotonina, identificada quimicamente como 5-hidroxitriptamina (5-HT), primeiramente foi atribuída a um papel de agente sérico que afeta o tonus vascular, e posteriormente, foi relacionada a uma ampla gama de papéis fisiológicos (Rang et al., 2003).

Desse modo, ao sistema serotoninérgico tem sido atribuído papéis relevantes em diversas funções fisiológicas e/ou comportamentais, como: afeto, agressão, apetite, cognição, função endócrina, função gastrointestinal, função motora, neurotrofismo, percepção, função sensorial, sexo, sono e função vascular (Aghajanian, 2002; Davis, 2002; Oquendo, 2003). No sistema nervoso os neurônios serotoninérgicos estão agrupados no tronco cerebral (Serretti et al., 2006), tendo esses neurônios do núcleos da rafe projeções ascendentes para o córtex cerebral, tálamo, hipotálamo e o sistema límbico. Nessas regiões, esses neurônios estão envolvidos no ciclo circadiano (ciclo sono-vigília, secreção hormonal e temperatura corporal), comportamento sexual, apetite e humor (Serretti et al, 2006).

Diferentes sistemas de neurotransmissores têm sido descritos como relevantes na determinação do humor (Olivier, 2015; van Enkhuizen et al., 2015 Yamada et al., 2014). Particularmente, é indiscutível a relevância da participação dos sistemas serotoninérgico nos mecanismos fisiológicos que regem os estados emocionais, como também, a participação deste sistema nas alterações de humor, como na depressão e no distúrbio de ansiedade (Olivier, 2015).

As ações fisiológicas do 5-HT são mediadas através de um amplo grupo de receptores, existindo pelo menos 14 tipos de receptores em mamíferos, isolados e classificados em sete principais famílias de acordo com critérios farmacológicos, traducionais e estruturais (Hoyer et al., 1997; 2002). Dentro desse amplo grupo de receptores estão, de particular interesse para esse estudo, o 5HT1A e 5HT2A. Estes receptores estão concentrados nas áreas corticais, límbicas, associadas à memória e cognição (Pazos, 1985; Hall, 1997; Meneses, 2007). O subtipo 5HT1A é particularmente interessante, já que é um dos principais mediadores da ação do 5-HT, regulando a atividade dos neurônios 5-HT via autorreceptores e a função de vários sistemas de neurotransmissores através de receptores pós-sinápticos (heteroreceptores) (Ogren et al., 2008). Alguns dados também suportam um papel potencial para o receptor 5-HT1A na consolidação da memória. Os resultados disponíveis também implicam o receptor 5-HT1A na recuperação de memórias aversivas ou emocionais, apoiando um envolvimento na reconsolidação. O subtipo 5HT2A está amplamente distribuído em regiões corticais, núcleo accumbente, núcleo caudado, tubérculas olfativas e hipocampo (Pazos et al., 1985, 1987b; López-Giménez et al., 1997, 2001a). Sua função tem sido amplamente associada ao consumo de drogas, sendo importante no processo de discriminação das propriedades estimulantes do etanol, como também, associado com as alterações no comportamento associado a depressão induzida pela nicotina. Além disso, parece influenciar na capacidade da nicotina em gerar sensibilização locomotora (para revisão ver: Muller e Homberg, 2015).

Outro componente importante na dinâmica da função serotoninérgica é o transportador de serotonina (5-HTT). Esta é uma proteína integral de membrana, que está localizado nos terminais pré-sinápticos, tendo a função de recaptar a serotonina após sua liberação nas fendas sinápticas, encerrando a ação sináptica e reciclando-a de maneira dependente do sódio (Lesch e Balling et al., 1994). O 5HTT tem sido relacionado a traços de personalidade que envolvem à ansiedade e os distúrbios de ansiedade, como também, nos transtornos de humor, resposta aos antidepressivos, reação depressiva a eventos estressantes, assim como, transtornos psicossomáticos, suicídios, alcoolismo, tabagismo, distúrbios alimentares, distúrbios de déficit de atenção e hiperatividade e autismo. (Serreti et al., 2006).

Quanto ao uso de drogas psicoativas, em geral, o foco principal das pesquisas está relacionado a seu uso indevido, visto que, a toxicodependência está associada à maior parte dos problemas relacionados com os danos individuais e sociais (Davidson, 2002; Nonkes, 2013). Vale ressaltar que a dependência a drogas possui alta comorbidade com outros distúrbios psiquiátricos que envolvem alterações do humor, como a depressão e os transtornos de ansiedade (Robbins e Everitt, 1999), sendo considerado que aqueles indivíduos que são propensos a uma transição de uso controlado para uso compulsivo e dependência apresentam patologias psiquiátricas pré e / ou comorbidas (Koob, 2013; Pickard, 2012).

O 5-HT mostrou ser de essencial importância não só para manter a neuroplasticidade ao longo da vida inteira (West et al., 1995), mas também para a geração de efeitos hedônicos (O'Leary et al., 2010) e motivacionais (Lee et al., 2010). Consequentemente, não é surpreendente que drogas de abuso, que provoquem mudanças profundas na atividade extracelular de 5-HT e de seus receptores, alterem os circuitos de organização do cérebro diretamente através da modulação do sistema 5-HT ou, indiretamente, por efeitos 5-HT em outros sistemas de neurotransmissores (Adell et al., 2010).

De particular interesse, vários fármacos aditivos têm efeitos agudos sobre a atividade serotoninérgica. A exposição crônica a drogas pode alterar os níveis de 5-HT nos tecidos, a atividade extracelular basal e a resposta do sistema serotoninérgico à administração aguda de outros fármacos. Neste sentido, alterações sobre a função serotoninérgica podem contribuir para a transição entre o consumo ocasional para dependência (Muller et al., 2015).

Existe uma estreita relação entre fumar ou consumir bebidas alcoólicas e o humor. O tabagismo, por exemplo, reduz a ansiedade, como também, o aumento da ansiedade tem sido relacionado como um importante sintoma da abstinência do tabaco (Hughes et al., 2000). De fato, tem sido sugerido que fumantes usam o tabaco visando modular os níveis de ansiedade (Gilbert et al., 1989; Picciotto et al., 2002). Em relação ao etanol, o aumento do consumo por

indivíduos ansiosos, um comportamento associado aos seus efeitos ansiolíticos agudos, e o aumento da ansiedade em alcoolistas abstêmios conduziram à hipótese de que a ansiedade também está envolvida na etiologia do consumo do álcool (para revisão: Heilig et al, 2010). Desse modo a associação entre tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas pode ser explicada por efeitos cumulativos do tabaco e do etanol no humor. Apesar disso, há poucas informações quanto às consequências da coexposição ao tabaco e ao etanol nos níveis de ansiedade e nos sistemas de neurotransmissores relacionados.

Modelos animais têm ajudado a esclarecer essa associação entre a exposição ao tabaco, em especial a nicotina, o álcool e desordens de humor. Recentemente avaliou-se o comportamento associado à ansiedade em camundongos expostos a fumaça de cigarros, ao etanol ou a ambas as drogas (fumaça + etanol) durante a adolescência. Nesse estudo, o efeito ansiolítico da exposição foi mais intenso nas fêmeas do grupo fumaça + etanol. Este resultado sugere que, se o mesmo ocorrer em humanos, mulheres podem combinar o consumo de tabaco e bebidas alcoólicas visando reduzir os níveis de ansiedade. Adicionalmente, um mês após o término da exposição, embora não tenham sido identificados efeitos do tabaco ou do etanol, machos e fêmeas de camundongo previamente expostos à fumaça + etanol exibiram uma resposta ansiogênica (Abreu-Villaça et al., 2013b). Este aumento da ansiedade após um longo período de privação pode estar associado a maior probabilidade de recaída ao uso de drogas nos indivíduos que eram fumantes e consumiam bebidas alcoólicas.

Tendo em vista evidências de efeitos da fumaça de cigarro e sua interação com o etanol no comportamento associado à ansiedade e entre outras desordens de humor em camundongos (Abreu-Villaça et al., 2013b), dando continuidade a esta linha de pesquisa, no presente estudo iremos investigar a resposta do sistema serotoninérgico a esses insultos. Alterações serotoninérgicas associadas à exposição ao tabaco e ao etanol podem ajudar no entendimento do co-abuso e fornecer uma base biológica para a associação destas drogas e os distúrbios do humor. Igualmente importante, nossos resultados poderão ajudar a identificar quais os riscos associados à exposição concomitante a estas drogas de abuso.

1. OBJETIVOS

Avaliar o sistema serotoninérgico central de camundongos adolescentes expostos à fumaça de cigarro e/ou etanol.

1.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos da fumaça de cigarro e/ou etanol sobre os marcadores serotoninérgicos no Córtex cerebral e Hipocampo ao final do período de exposição;
- b) Avaliar os efeitos da fumaça de cigarro e/ou etanol sobre os marcadores serotoninérgicos no Córtex cerebral e Hipocampo após curto período de retirada das drogas;
- c) Avaliar os efeitos da fumaça de cigarro e/ou etanol sobre os marcadores serotoninérgicos no Córtex cerebral e Hipocampo após longo período de retirada das drogas em animais adultos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

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

Os experimentos descritos aqui foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG / UERJ (protocolo nº CEUA/014/2011) e esta de acordo 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.

Para a realização deste trabalho foram utilizados aproximadamente 240 camundongos suíços do total de 44 ninhadas de ambos os sexos (120 machos e 120 fêmeas) produzidos e mantidos em um biotério próprio do departamento com ciclo diário de 12 horas claro/escuro (escuro a partir das 13 horas), temperatura controlada e mantida em torno de 21° C, com livre acesso à água e comida. Os tecidos cerebrais utilizados no presente trabalho foram coletados de animais provenientes de um estudo prévio (Abreu-Villaça et al, 2013b).

2.1 Formação dos grupos experimentais

Fêmeas nulíparas foram acasaladas (3 fêmeas:1 macho) e a fim de evitar a influência do tamanho da ninhada, somente foram utilizadas neste estudo ninhadas cujas mães geraram entre 8 a 12 filhotes. Os filhotes oriundos desses acasalamentos foram desmamados no 21º dia pós-natal (PN). Em PN30, os animais de cada ninhada foram aleatoriamente distribuídos para os diferentes grupos experimentais.

Desta forma, o estudo completo do impacto da exposição à fumaça de cigarro e/ou etanol requereu a formação de 4 grupos experimentais:

- a) **Veículo (VEH)**. Animais expostos à salina i.p e a ar corrente;
- b) **Fumaça (SMK)**. Animais expostos à fumaça de cigarros e à salina i.p;
- c) **Etanol (ETOH)**. Animais expostos à etanol i.p. e a ar corrente em uma câmara semelhante à câmara de exposição à fumaça;

d) **Fumaça+Etanol (SMK+ETOH).** Animais expostos à etanol i.p. e a fumaça de cigarros.

Os camundongos adolescentes foram expostos à fumaça de cigarro 8h/dia do 30º ao 45º o dia de vida pós-natal (PN30-PN45) visando atingir níveis de exposição de fumantes ativos. A fumaça foi gerada a partir de cigarros para pesquisa (Universidade de Kentucky, Lexington, KY, EUA) tipo 2R1F (nicotina = 1,74mg/cigarro) em uma máquina de queima de cigarros (Figura 1, Teague Enterprises, Davis, CA, EUA). Os animais que não receberam esta exposição foram alocados em uma câmara com ar corrente localizada na mesma sala da máquina de queima de cigarros. Os níveis séricos de cotinina não diferiram entre os grupos SMK e SMK+ETOH. Os animais dos grupos VEH e ETOH apresentaram níveis de cotinina abaixo do limite de detecção da técnica (<8ng/ml) (Abreu-Villaça et al, 2013b).

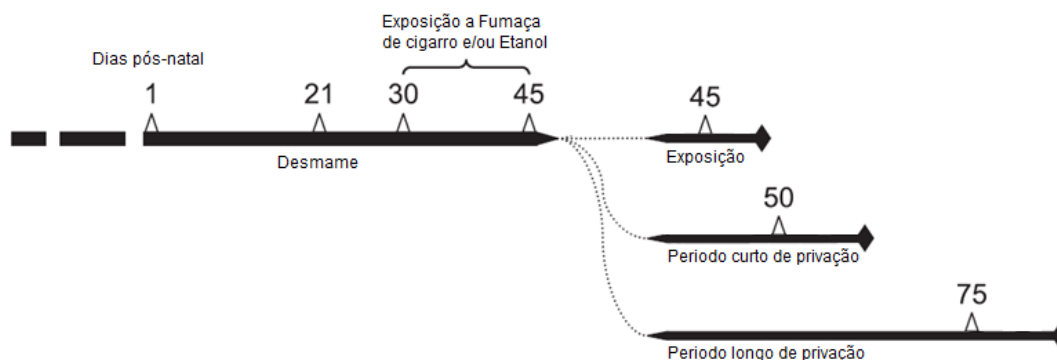
Em relação ao etanol, foi escolhida uma dose moderada (2g/kg, 25%, v/v) a ser administrada i.p. em dias alternados, visando nos aproximarmos de um padrão intermitente de consumo. Já os grupos não expostos ao etanol receberam uma solução salina i.p também em dias alternados. Os níveis séricos de etanol não diferiram entre os grupos expostos ETOH e SMK+ETOH, enquanto os animais VEH e SMK apresentaram valores de etanol não detectáveis (Abreu-Villaça et al , 2013b).

Figura 1 - Máquina de cigarros (Teague Enterprises, Davis, CA, EUA)



Visando avaliar tanto efeitos da exposição como da abstinência, os tecidos cerebrais foram coletados em três momentos: em PN45, ao final da exposição; em PN50 após curto período de retirada; em PN75 após longo período de retirada. A Figura 2 descreve resumidamente a linha temporal do desenho experimental.

Figura 2 - Linha temporal desde o nascimento, desmame, período de exposição e períodos de retirada



Os tecidos cerebrais que foram utilizados no presente estudo são originários de animais que foram submetidos a análise comportamental no labirinto em cruz elevado e no campo aberto durante a exposição no período da adolescência, durante o período de retirada e na idade adulta. Os dados comportamentais gerados deram origem a uma publicação (Abreu-Villaça et al, 2013b). Visando reduzir o número de animais utilizados, os animais previamente submetidos aos testes comportamentais foram decapitados, os tecidos de diferentes regiões cerebrais coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Escolha das regiões estudadas

Tendo em vista a importância do córtex cerebral e do hipocampo e ainda suas relações com o sistema serotoninérgico central, o presente estudo optou por avaliar a marcação: do 5HT1A no córtex cerebral e hipocampo; 5HT2A somente no córtex cerebral, visto o pequeno volume do hipocampo dos camundongos suíços optou-se por não avaliar a marcação do 5HT2 nesta área; do 5HTT no córtex cerebral e hipocampo.

2.3 Medidas Bioquímicas

Para a quantificação dos receptores serotoninérgicos 5HT1_A, 5HT2 e o Transportador

5HTT foram utilizados os radioligantes [³H] 8-OH- DPAT, [³H] Ketanserina e a [³H] Paroxetina, respectivamente.

Os tecidos, que foram previamente congelados, foram descongelados e homogeneizados (Ultra-turrax T10 basic, IKA, São Paulo, SP) em uma diluição de 20 vezes em 50 mM Tris-HCl (pH 7,4). Para preparar a fração de membrana celular, os homogeneizados foram sedimentados a 40.000xg durante 10 minutos e a solução sobrenadante foi descartada. Os sedimentos de membrana foram ressuspensos (Ultra-turrax) no volume original de tampão, ressedimentados, e os sedimentos resultantes foram ressuspensos em uma diluição de 10 vezes no mesmo tampão, usando um homogeneizador equipado com um pilão de vidro Teflon.

a) Para avaliação do receptor 5HT_{1A}, as frações de membrana celular foram preparadas e incubadas com 1 nM de [³H] 8-OH- DPAT (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA), na presença ou ausência de 10 μM de serotonina para identificar marcação inespecífica, por cerca de 30 minutos em banho a 25°C. As membranas marcadas foram separadas da radiação livre e capturadas em filtros de fibra de vidro por filtração a vácuo. Os valores foram então calculados como ligação específica por mg de proteína de membrana (BCA Protein Assay);

b) Para avaliação do receptor serotoninérgico 5HT₂, as frações de membrana celular foram preparadas e incubadas com 1 nM de [³H]ketanserina (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) na presença ou ausência de 10 μM de metilsergídeo para identificar marcação inespecífica, por cerca de 15 minutos em banho a 30°C. Membranas marcadas foram capturadas em filtros de fibra de vidro, por filtração a vácuo. Os valores foram então calculados como ligação específica por mg de proteína de membrana (BCA Protein Assay);

c) Para avaliação do transportador pré-sináptico de serotonina, as frações de membrana celular foram preparadas e incubadas com 85 pM de [³H] paroxetina (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA), na presença ou ausência de 100 μM de serotonina para identificar marcação inespecífica, por cerca de 120 minutos em banho a 20°C. Membranas marcadas foram capturadas em filtros de fibra de vidro. Os valores serão então calculados como ligação específica por mg de proteína de membrana (BCA Protein Assay).

Para a medição do conteúdo proteico deste preparado foi utilizando o kit Ácido Bicinonínico (kit BCA, Sigma) e quantificado em leitora de Elisa.

2.4 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados pela utilização de ANOVAs para cada região cerebral e biomarcador. Foram considerados os fatores Tratamento e Sexo. Efeitos de Tratamento foram seguidos de análise *post-hoc* pelo teste *Fisher's Protected Least Significant Difference* (FPLSD) para avaliação de diferenças entre grupos experimentais. Interações entre os fatores foram seguidas de ANOVAs de menor ordem e testes FPLSD.

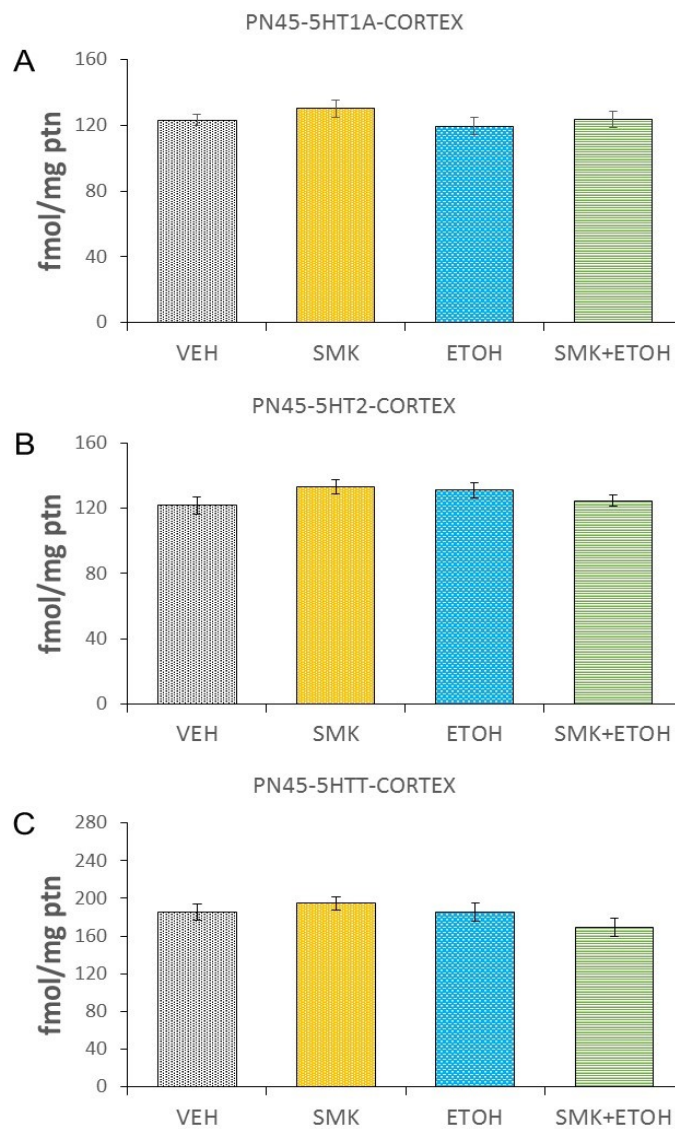
3 RESULTADOS

3.1 Durante o período de exposição as drogas

3.1.1 Córtex Cerebral

A análise em PN45 não indicou efeito do TRATAMENTO ou interação entre TRATAMENTO x SEXO para todos os marcadores estudados no córtex cerebral (Figura 3).

Figura 3 - Avaliação dos biomarcadores serotoninérgicos em PN45 no córtex cerebral



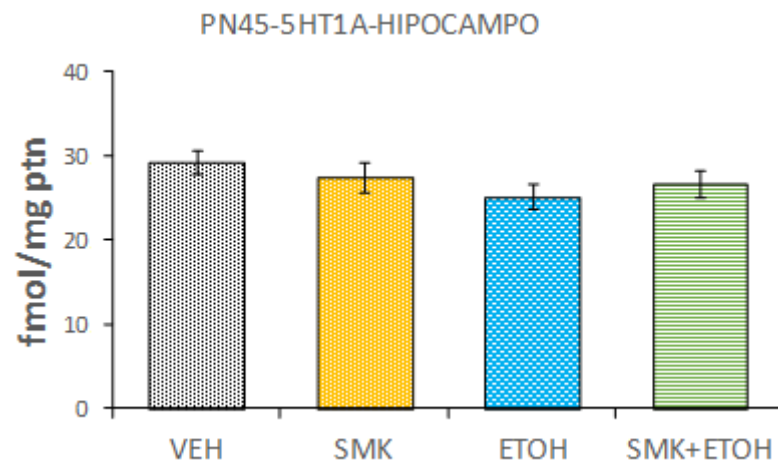
Legenda: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo; SMK, fumaça; ETOH, etanol; SMK+ETOH, fumaça + etanol. (A) Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A, VEH (n=16); SMK (n=17); ETOH (n=16); SMK+ETOH (n=16). (B) Marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 VEH (n=16); SMK

(n=16); ETOH (n=16); SMK+ETOH (n=16). (C) Marcação do transportador serotoninérgico 5HTT, VEH (n=16); SMK (n=16); ETOH (n=16); SMK+ETOH (n=16). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.1.2 Hipocampo

A análise em PN45, período de exposição, não indicou efeito do TRATAMENTO ou interação significativa entre TRATAMENTO x SEXO ($P > 0,05$) para a marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A no hipocampo (Figura 4).

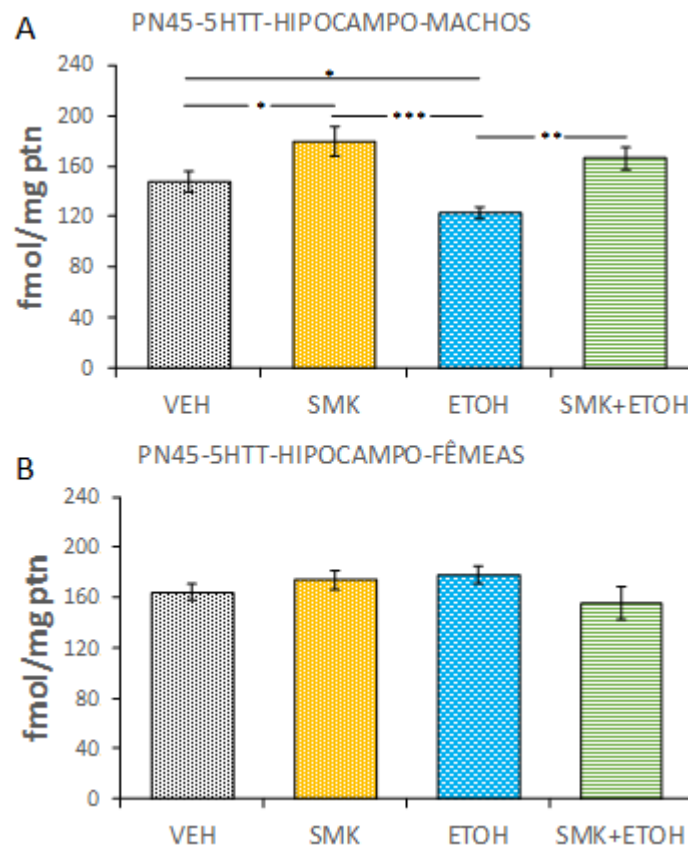
Figura 4 - Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A pelo [^3H] 8-OH- DPAT ao final período de exposição no hipocampo



Legenda: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo (n=18); SMK, fumaça (n=18); ETOH, etanol (n=18); SMK+ETOH, fumaça + etanol (n=18). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

Na avaliação da marcação do transportador serotoninérgico 5HTT pela [^3H] paroxetina foi observado interação significativa entre TRATAMENTO x SEXO ($F_{(3,62)} = 5,5$; $P = 0,002$). A avaliação separada para cada sexo só indicou efeito do TRATAMENTO para os machos ($F_{(3,30)} = 7,9$; $P < 0,001$). Nos machos (Figura 5A), a exposição a fumaça de cigarro promoveu aumento da marcação do transportador serotoninérgico ($P < 0,05$), enquanto que a exposição ao etanol produziu redução ($P = 0,05$). A análise da coexposição indicou um efeito aditivo, não sendo o grupo SMK+ETOH diferente do grupo controle VEH. Já a análise das fêmeas não mostrou dados significativos para tratamento ($P > 0,05$).

Figura 5 - Marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 pela [³H] Ketanserina ao final período de exposição no hipocampo



Legenda: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo; SMK, fumaça; ETOH, etanol; SMK+ETOH, fumaça + etanol. (A) Machos, VEH (n=9); SMK (n=9); ETOH (n=9); SMK+ETOH (n=7). (B) Fêmeas, VEH (n=9); SMK (n=9); ETOH (n=9); SMK+ETOH (n=9). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

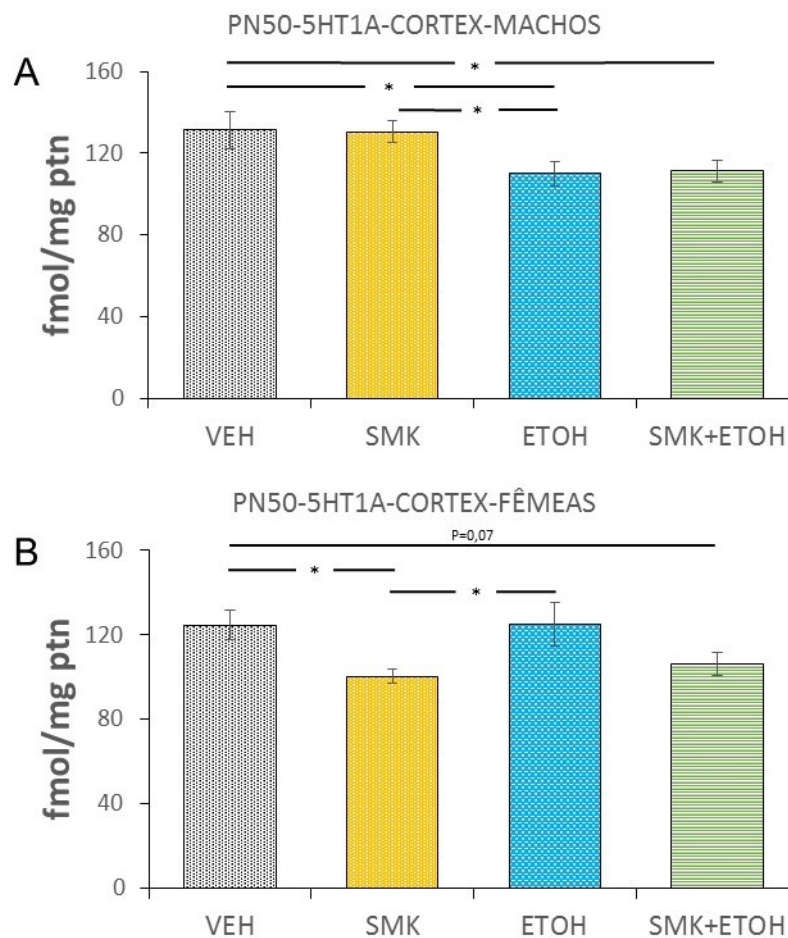
3.2 Após curto período de retirada (PN50)

3.2.1 Córtex Cerebral

Na avaliação da marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A após curto período de retirada foi observado interação significativa entre TRATAMENTO x SEXO ($F_{(3,56)} = 3,5$; $P = 0,02$). Camundongos machos apresentaram efeito significativos do TRATAMENTO ($F_{(3,28)} = 2,9$; $P = 0,04$). Machos de ambos os grupos expostos ao etanol (ETOH e SMK+ETOH) apresentaram redução da marcação do receptor 5HT1A após curto período de retirada (VEH > ETOH, $P = 0,03$; VEH > SMK+ETOH, $P = 0,04$), sendo estes efeitos considerados aditivos

(Figura 6A). Nas fêmeas também se observou efeito do TRATAMENTO ($F_{(3,28)} = 3,2$; $P = 0,03$). Fêmeas após curto período de retirada da fumaça de cigarro apresentaram redução da marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A ($P=0,02$, Figura 6B). A coexposição com etanol reverteu parcialmente o efeito de retirada da fumaça de cigarro, onde o grupo SMK+ETOH apenas apresentou tendência a redução ($P = 0,07$), sendo este efeito aditivo.

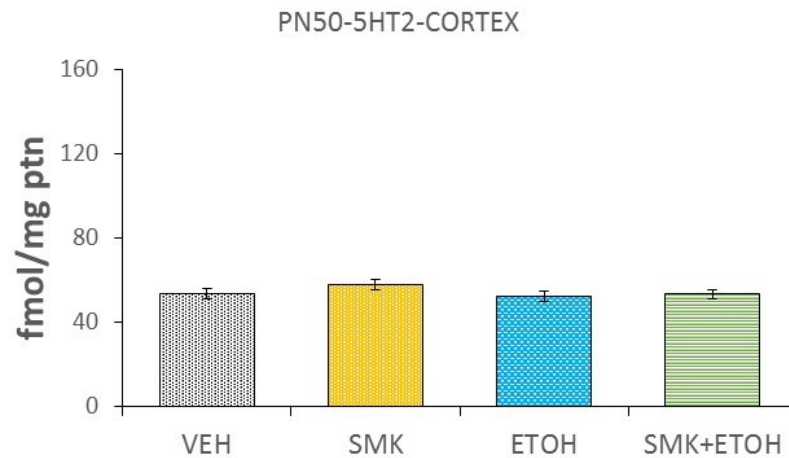
Figura 6 - Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A pelo [3 H] 8-OH- DPAT após curto período de retirada (PN50)



Legenda: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo; SMK, fumaça; ETOH, etanol; SMK+ETOH, fumaça + etanol. (A) Machos, VEH (n=8); SMK (n=8); ETOH (n=8); SMK+ETOH (n=8). (B) Fêmeas, VEH (n=8); SMK (n=8); ETOH (n=8); SMK+ETOH (n=8). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

A análise em PN50, não indicou efeito do TRATAMENTO ou interação entre TRATAMENTO x SEXO para marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 pela [3 H] Ketanserina no córtex cerebral (Figura 7).

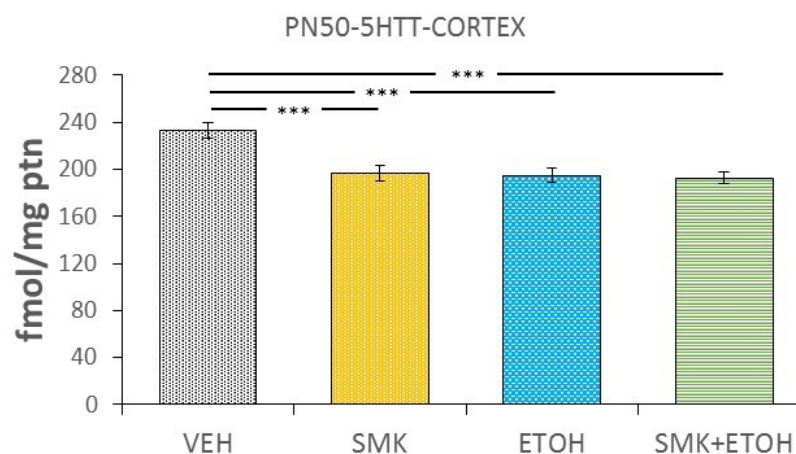
Figura 7 - Marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 pela [³H] Ketanserina após curto período de retirada (PN50)



Legenda: Valores representam média ± erro padrão da média. VEH, veículo (n=16); SMK, fumaça (n=16); ETOH, etanol (n=16); SMK+ETOH, fumaça + etanol (n=16). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

Para marcação do transportador serotoninérgico 5HTT pela [³H] Paroxetina observamos efeito do tratamento em PN50 ($F_{(3, 55)} = 8,9$; $P < 0,001$). O curto período de retirada das drogas promoveu redução significativa para todos os grupos experimentais estudados ($P < 0,001$) em todas as comparações com o grupo controle, (Figura 8).

Figura 8 - Marcação do transportador serotoninérgico 5HTT pela [³H] Paroxetina no córtex cerebral em PN 50

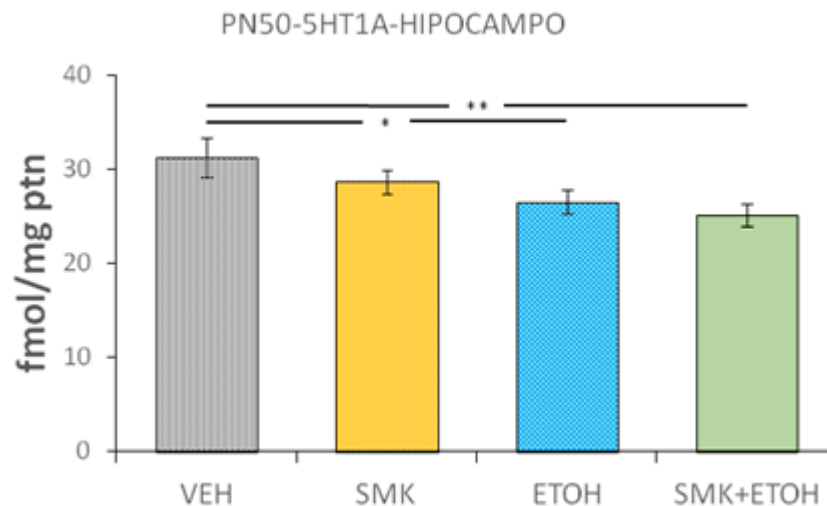


Legenda: Valores representam média ± erro padrão da média. VEH, veículo (n=16); SMK, fumaça (n=15); ETOH, etanol (n=16); SMK+ETOH, fumaça + etanol (n=16). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

3.2.2 Hipocampo

Em PN50, período de curta retirada, foi observado efeito do TRATAMENTO ($F_{(3,56)} = 3,4$; $P=0,02$) para a marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A. Animais em ambos os grupos expostos ao etanol (ETOH e SMK+ETOH) apresentaram redução da marcação do receptor 5HT1A após curto período de retirada (VEH > ETOH, $P < 0,05$; VEH > SMK+ETOH, $P < 0,01$; Figura 9).

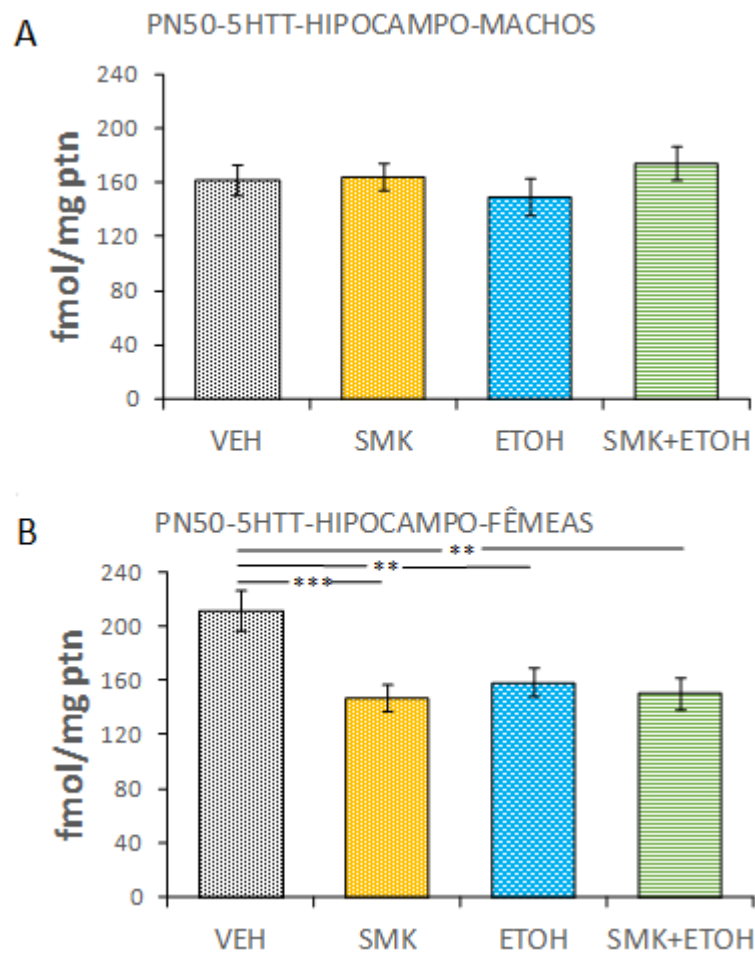
Figura 9 - Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A pelo [3 H] 8-OH- DPAT no hipocampo após curto período de retirada das drogas



Legenda: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo (n=16); SMK, fumaça (n=16); ETOH, etanol (n=16); SMK+ETOH, fumaça + etanol (n=16). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Para a marcação do 5HTT, observamos um interação significativa entre TRATAMENTO x SEXO ($F_{(3,58)} = 3,9$; $P < 0,05$). Após a análise em separado para cada sexo, observamos que o efeito do TRATAMENTO ocorreu apenas nas fêmeas ($F_{(3,30)} = 6,3$; $P < 0,01$). Fêmeas de todos os grupos experimentais apresentaram redução da marcação do 5HTT no hipocampo em PN50 (VEH > SMK, $P < 0,001$; VEH > ETOH, $P < 0,01$; VEH > SMK+ETOH, $P < 0,001$, Figura 10B) em relação aos animais controles.

Figura 10 - Marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 pela [³H] Ketanserina após curto período de retirada



Legenda: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo; SMK, fumaça; ETOH, etanol; SMK+ETOH, fumaça + etanol. (A) Machos, VEH (n=8); SMK (n=8); ETOH (n=8); SMK+ETOH (n=8). (B) Fêmeas, VEH (n=8); SMK (n=10); ETOH (n=8); SMK+ETOH (n=8). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

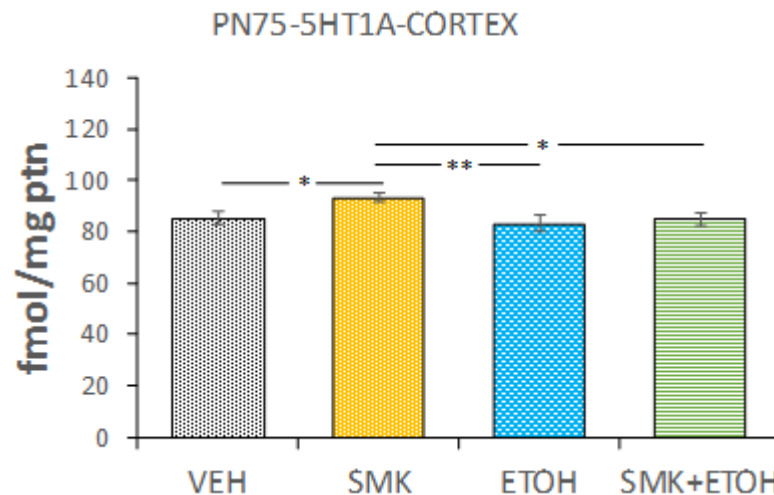
3.3 Após longo período de retirada (PN75)

3.3.1 Córtex cerebral

Para a marcação do receptor 5HT1A foi observado efeito significativo do TRATAMENTO ($F_{(3,59)} = 2,8$; $P < 0,05$). Após longo período de retirada animais expostos

somente a fumaça de cigarro apresentaram aumento da marcação do receptor 5HT1A (VEH < SMK, $P < 0,05$), entretanto, a coexposição com etanol reverteu este efeito (Figura 11).

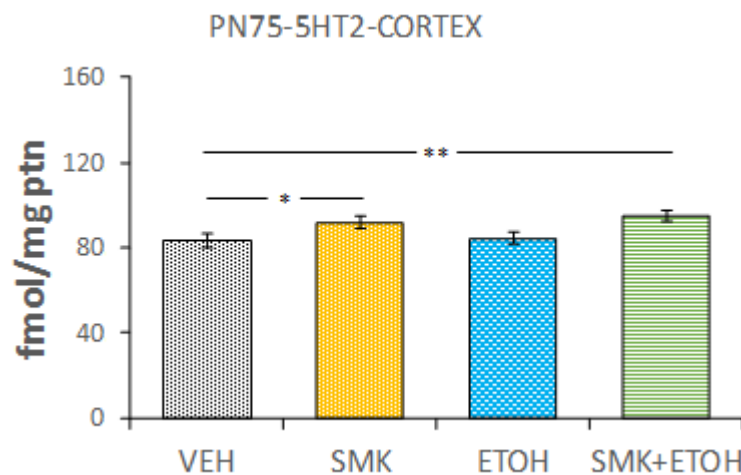
Figura 11 - Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A pelo [³H] 8-OH- DPAT no córtex cerebral em PN 75



Fonte: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo (n=16); SMK, fumaça (n=17); ETOH, etanol (n=18); SMK+ETOH, fumaça + etanol (n=16). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

A análise da marcação do receptor 5HT2 também revelou efeito da retirada das drogas em PN75 ($F_{(3,63)} = 3,3$; $P < 0,05$). No caso deste receptor ambos os grupos que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência (SMK e SMK+ETOH) apresentaram aumento da marcação do receptor 5HT2 após longo período de retirada (Figura 12).

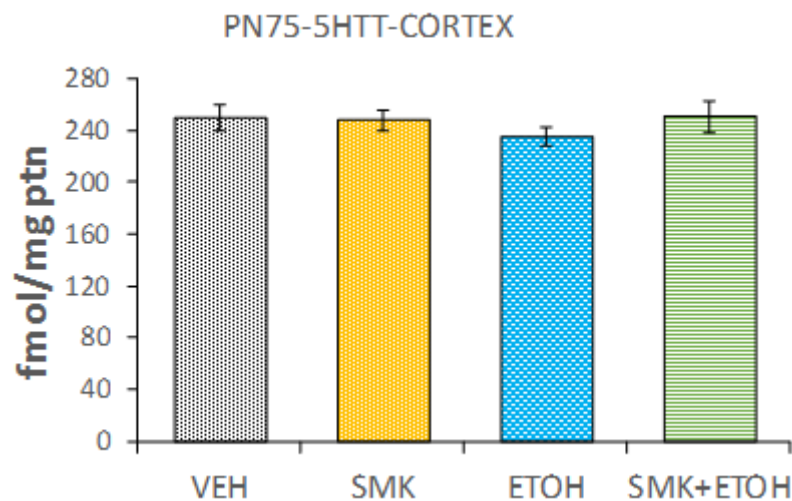
Figura 12 - Marcação do receptor serotoninérgico 5HT2 pela [³H] Ketanserina no córtex cerebral em PN 75



Fonte: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo (n=16); SMK, fumaça (n=19); ETOH, etanol (n=20); SMK+ETOH, fumaça + etanol (n=16). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Já a análise da marcação do transportador 5HTT, no córtex cerebral em PN75 não indicou diferenças significativas entre os grupos experimentais independente do sexo (Figura 13).

Figura 13 - Marcação do transportador serotoninérgico 5HTT pela [³H] Paroxetina no córtex cerebral em PN 75

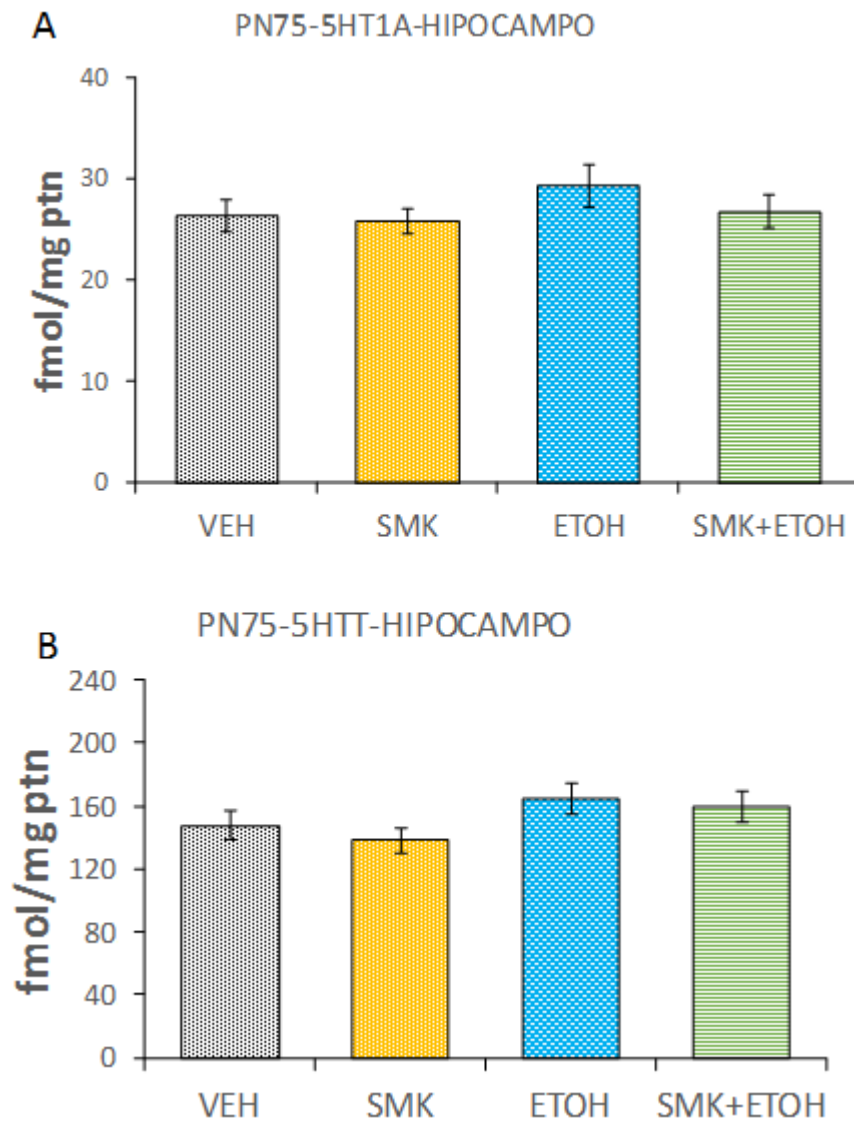


Fonte: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo (n=16); SMK, fumaça (n=17); ETOH, etanol (n=18); SMK+ETOH, fumaça + etanol (n=16). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

3.3.2 Hipocampo

A análise da marcação do receptores serotoninérgicos 5HT1A e do transportador 5HTT em PN75, período de longa retirada, não identificou efeitos significativos do TRATAMENTO, SEXO ou interação TRATAMENTO x SEXO no hipocampo (Figura 14).

Figura 14 - Avaliação dos biomarcadores serotoninérgicos após longo período de retirada (PN75) no hipocampo



Fonte: Valores representam média \pm erro padrão da média. VEH, veículo; SMK, fumaça; ETOH, etanol; SMK+ETOH, fumaça + etanol. (A) Marcação do receptor serotoninérgico 5HT1A VEH (n=15); SMK (n=16); ETOH (n=17); SMK+ETOH (n=17). (B) Marcação do transportador serotoninérgico 5HTT, VEH (n=14); SMK (n=16); ETOH (n=16); SMK+ETOH (n=19). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

4 DISCUSSÃO

Alguns estudos têm demonstrado que as drogas de abuso induzem mudanças profundas na atividade do sistema serotoninérgico central (para revisão ver Muller e Homberg, 2015). Desta forma, tem sido postulado que essas alterações serotoninérgicas tornam o sistema nervoso suscetível à transição para comportamentos compulsivos de uso de drogas e, muitas vezes, se sobrepõem com fatores de risco genéticos para a dependência (Muller e Homberg, 2015). Particularmente, tem sido observada uma sobreposição considerável de efeitos sobre o sistema serotoninérgico entre a exposição à nicotina (principal componente psicoativo do tabaco) e o etanol (Muller e Homberg, 2015). Entretanto, não são conhecidos os efeitos da exposição em separado do tabaco e do etanol durante a adolescência, período de susceptibilidade em que se inicia o abuso e no qual a exposição tem sido mais fortemente associada a distúrbios do humor. Apesar da forte associação entre o consumo de tabaco e etanol (Dawson, 2000; Grant, 1998; Larsson e Engel, 2004; Meyerhoff et al, 2006) e da existência de evidências que apontam para uma base neuroquímica para tal associação (Ribeiro-Carvalho, et al., 2008; 2009; Abreu-Villaça, et al., 2015), os efeitos combinados sobre o sistema serotoninérgico nunca foram investigados. Após uma breve reapresentação dos resultados, discutirei o nosso modelo de exposição a fim de avaliar a intensidade da exposição gerada e a possível translação com o perfil de consumo em humanos adolescentes, como também as limitações metodológicas dos ensaios realizados. Após, discutirei, à luz do conhecimento atual baseado em experimentos com animais adultos, os efeitos de cada droga sobre as alterações serotoninérgicas durante a adolescência, como também as possíveis interações durante a coexposição. Além disso, avaliarei o curso temporal das alterações geradas pela abstinência (curto e longo prazo).

4.1 Resumo dos resultados

Nossos dados demonstram que o sistema serotoninérgico é afetado pela exposição a ambas as drogas durante a adolescência e também que estas programam alterações que aparecem mesmo após longo período de abstinência. Nosso estudo ainda indica que o curso temporal da abstinência envolve alterações distintas no sistema serotoninérgico dependendo

da duração da retirada. Além disso, observamos que as drogas interagem durante a exposição gerando efeitos aditivos e, em alguns casos, promovendo a reversão. Outro fato a destacar é que as alterações observadas são complexas e muitas vezes dependentes do sexo. Ao final do período de exposição, animais machos SMK apresentaram aumento da marcação do 5HTT no hipocampo, o que pode indicar aumento do número de terminais serotoninérgicos, enquanto animais ETOH apresentaram redução. A coexposição representou a soma dos efeitos individuais e, conseqüente, reversão das alterações observadas em cada droga. De modo geral, após curto período de abstinência, animais SMK fêmeas foram mais susceptíveis, apresentando tanto redução na marcação do 5HT1A no córtex cerebral quanto redução do 5HTT no córtex cerebral e hipocampo. Animais expostos ao etanol também apresentaram redução na marcação do 5HT1A em ambos os sexos no hipocampo. Esta redução só ocorreu no córtex cerebral em machos. Animais ETOH também apresentaram redução da marcação do 5HTT, em ambos os sexos no córtex cerebral e somente em fêmeas no hipocampo. Particularmente, nos animais coexpostos houve redução da marcação do 5HT1A em ambos os sexos, mas a redução observada do 5HTT foi consistente com o padrão observado por animais expostos isoladamente ao etanol e ao tabaco. A fumaça de cigarro gerou também conseqüências após longo período de retirada. Em PN75, que representa o início da idade adulta em roedores, animais SMK apresentaram um aumento da marcação de 5HT1A e 5HT2 no córtex cerebral. A coexposição com etanol reverteu este efeito sobre o 5HT1A. Os resultados deste estudo estão apresentados de forma resumida na tabela 1.

Tabela 1 - Resumo dos resultados

Idade	Tratamento	5HT1A	5HT2	5HTT
PN45	SMK	(-)	(-)	↑ nos machos HP
	ETOH	(-)	(-)	↓ nos machos HP
	SMK+ETOH	(-)	(-)	(-)
PN50	SMK	↓ nas fêmeas CX	(-)	↓ CX ↓ HP nas fêmeas
	ETOH	↓ nos machos CX ↓ HP	(-)	↓ CX ↓ HP nas fêmeas
	SMK+ETOH	↓CX em ambos sexos ↓HP	(-)	↓CX ↓ HP nas fêmeas
PN75	SMK	↑ CX	↑ CX	(-)
	ETOH	(-)	(-)	(-)
	SMK+ETOH	(-)	↑ CX	(-)

Legenda: CX, córtex cerebral; HP, hipocampo. ↑ representa aumento da marcação; ↓ representa redução da marcação; (-) sem efeito.

4.2 Modelo de exposição às drogas

Os cérebros usados no presente estudo foram oriundos de animais utilizados em um projeto anterior publicado na revista *Drug and Alcohol Dependence* (Abreu-Villaça et al., 2013b). Neste trabalho, alguns animais em separado tiveram os níveis de exposição à fumaça de cigarro e etanol avaliados. Os níveis de exposição fumaça de cigarro foram medidos através da concentração plasmática de cotinina, principal metabólito da nicotina e que possui uma meia-vida mais longa que a mesma, após 4 horas de exposição do último dia em PN45. As doses de cotinina em animais SMK foram de 65 ± 2 ng/mL em machos e 69 ± 7 ng/mL em fêmeas. Já no grupo SMK+ETOH foram de 65 ± 16 ng/mL em machos e 75 ± 13 ng/mL em fêmeas. Nenhuma diferença entre os grupos foi observada (Abreu-Villaça et al., 2013b). Para a avaliação do etanol plasmático, o sangue foi coletado 30 minutos após a última injeção. Da mesma forma que para a cotinina, não foram encontradas diferenças na concentração de etanol em sangue entre os grupos ETOH e SMK+ETOH. Os valores alcançados foram (machos e fêmeas respectivamente): 172 ± 22 e 238 ± 26 mg/dL no grupo ETOH e de 164 ± 36 e 222 ± 22 mg/dL no grupo SMK+ETOH. Considerando as diferenças metabólicas entre roedores e humanos, podemos dizer que o nível de exposição à fumaça gerou valores equivalentes aos encontrados em humanos adolescentes (Eckardt et al., 1998). Na mesma direção, os valores encontrados na concentração de etanol no sangue são equivalentes aos encontrados em episódios de consumo abusivo, forma mais comum de uso entre adolescentes (Krahe et al., 2017). Vale ainda ressaltar que nossos dados não indicam que a fumaça de cigarro e o etanol possuíram interações farmacocinéticas que poderiam explicar as diferenças neuroquímicas encontradas no presente estudo.

4.3 Interpretação dos biomarcadores

O estudo utilizou como técnica de avaliação do sistema serotoninérgico ensaios de “*binding*”, ou seja, ensaios de marcação por moléculas radioativas que possuem afinidades aos receptores 5HT_{1A}, 5HT₂ e ao transportador 5HTT. Ensaios deste tipo são capazes de avaliar respostas de supregulação ou infraregulação, sendo estas respostas derivadas de alterações na afinidade ou densidade dos receptores medidos, no caso o 5HT_{1A} e 5HT₂. No

presente trabalho os ensaios foram realizados utilizando somente uma concentração de radioligante, permitindo apenas detecção na mudança de marcação, mas não possibilitando estabelecer se este fato se dá por mudança na sua densidade (B_{max}) ou na afinidade do receptor (K_d). Este desenho experimental se faz necessário devido a limitações técnicas do modelo de estudo. Muitas concentrações de radioligante envolveriam um maior número de ensaios, tornando necessário um maior volume tecidual e tornando-o inviável, já que é necessária a presença de todos os grupos experimentais em um mesmo ensaio. Vale ressaltar que alterações crônicas geradas pela exposição de drogas de abuso envolvem principalmente alteração da densidade dos receptores, como demonstrado por Trauth e colaboradores (1999) que a supregulação dos receptores colinérgicos nicotínicos pela nicotina representa um aumento do número de receptores sem alterações de afinidade (Trauth et al., 1999). De qualquer forma, estudos futuros utilizando várias doses de radioligantes ou outras técnicas de detecção seriam necessários para a confirmação se as alterações observadas aqui são mesmo devidas a mudanças de densidade dos receptores estudados.

A atividade do receptor 5-HT_{1A} está relacionada à redução dos comportamentos associados a ansiedade e depressão. Por exemplo, a buspirona, agonista dos receptores 5-HT_{1A}, possui eficácia no alívio da ansiedade e da depressão (Parks et al., 1987; Kennett et al., 1998). A dessensibilização do autorreceptor 5-HT_{1A} e o aumento da ativação pós-sináptica do receptor 5-HT_{1A}, através de aumentos gerais nos níveis de serotonina, demonstraram ser um importante mediador nos benefícios terapêuticos da maioria dos suplementos antidepressivos, incluindo precursores de serotonina e inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) (Celada et al., 2004). De modo inverso, pacientes em depressão e com ideação suicida possuem mais receptores 5-HT_{2A} do que pessoas saudáveis (Eison e Mullins, 1998; Celada et al., 2004). Esses achados sugerem que a supregulação pós-sináptica dos receptores 5-HT₂ está envolvida na patogênese da depressão. Em relação ao transportador de 5-HT, vale ressaltar que apesar de realizar a receptação de serotonina, e assim poder refletir uma alteração no tempo da presença de serotonina na fenda sináptica, esta proteína tem se mostrado constitutiva. Em outras palavras, alterações na sua marcação têm sido amplamente associadas a mudanças na proliferação ou perda de terminais serotoninérgicos (Slotkin et al., 1999; Raines et al., 2001; Xu et al., 2001; Slotkin et al., 2014).

4.4 Efeitos da exposição e abstinência da fumaça de cigarro

Pouco se sabe ainda sobre os efeitos da nicotina e principalmente da fumaça de cigarro sobre o sistema serotoninérgico. Particularmente, a exposição aguda de nicotina promove aumento na liberação e *turnover* de serotonina (Singer et al., 2004) no córtex cerebral e área tegmental ventral por mecanismos ainda não conhecidos. Este efeito ainda pode ser potencializado no tabaco pela presença de substâncias inibidoras da enzima monoamino oxidase (MAO), enzima que promove a degradação de monoaminas, aumentando a disponibilidade de serotonina nos terminais sinápticos (Guillem et al., 2005). Desta forma, é possível especular que a fumaça de cigarro promove alterações plásticas deste sistema quando se dá de forma prolongada. Entretanto, no presente trabalho não observamos nenhum efeito nos receptores ao final da exposição em nenhuma das áreas estudadas, sugerindo que estes receptores não são alvos importantes de alterações promovidas pelo tabagismo durante a adolescência. No entanto, identificamos que a exposição ao tabaco gera supregulação do 5-HTT em animais machos, sugerindo aumento do número de terminais serotoninérgicos no hipocampo. Podemos levantar a hipótese que este efeito em machos poderia representar uma resposta compensatória da estimulação serotoninérgica pelo tabaco (nicotina + inibidores da MAO) que não acontece nas fêmeas. De fato, uma das características do tratamento crônico de antidepressivos inibidores seletivos da receptação da serotonina (SSRI) em roedores é o aumento da neurogênese no hipocampo (Song et al., 2017). Considerando que efeitos de súbita retirada (“*craving*”) do tabaco têm sido mais comumente descritos em adolescentes mulheres (Wileyto et al., 2009), podemos ter como hipótese que o aumento dos terminais serotoninérgicos pode representar uma adaptação protetora em machos. Estes efeitos foram restritos ao hipocampo, isto pode estar associado ao fato do hipocampo possuir sua axogênese e sinaptogênese mais tardiamente que o córtex cerebral, ocorrendo muito remodelamento sináptico durante a adolescência (Zimmer, 1978). Além disso, vale ressaltar que há distinções entre as inervações a partir dos núcleos da rafe para o córtex e hipocampo (Hensler et al., 2006). Em acordo com os nossos dados, Xu e colaboradores (2001) demonstraram que o transportador serotoninérgico hipocampal é sensível a alterações quando animais adolescentes são expostos à nicotina.

Muitas alterações de humor são frequentes após a retirada do tabaco. A abstinência deste promove o surgimento de sintomas da depressão e aumento da ansiedade, que normalmente são revertidos após a reintrodução do hábito de fumar (Stage et al., 1996). Um

recente estudo demonstrou que mulheres jovens tabagistas possuem efeitos negativos mais intensos no humor durante a privação do tabaco do que homens da mesma idade (Faulkner et al., 2018). Estudos em animais já apontavam para esta possibilidade. Animais fêmeas expostas a nicotina (Ribeiro-Carvalho et al., 2011; Abreu-Villaça et al., 2008) e ao tabaco (Abreu-Villaça et al., 2013b) apresentam durante curto período de retirada efeitos mais intensos sobre comportamentos associados à ansiedade e depressão. No presente estudo, observamos que animais fêmeas apresentaram redução da marcação dos receptores 5-HT_{1A} e 5HTT no córtex cerebral, o que pode representar uma disfunção drástica na função serotoninérgica cortical. Além disso, fêmeas apresentam redução da marcação do 5HTT no hipocampo. Machos também foram afetados, porém só apresentaram redução da marcação do 5HTT no córtex cerebral, indicando que a perda de terminais serotoninérgicos corticais é comum a ambos os sexos durante curto período de abstinência. Tomados em conjunto, esses dados apontam que há disfunção serotoninérgica durante curto período de retirada do tabaco, sendo esta perda funcional mais proeminente em animais fêmeas. Acreditamos que estas alterações podem estar associadas as alterações de humor comuns na abstinência do tabaco em adolescentes e ainda corrobora o fato de mulheres jovens serem grupo de risco para efeitos negativos da abstinência.

Após longo prazo de retirada os efeitos encontrados na marcação do 5HTT são revertidos, mas observamos um aumento da marcação cortical de ambos receptores 5HT_{1A} e 5HT₂. Particularmente, apesar de não haver evidências da participação do receptor 5-HT₂ na autoadministração de nicotina, a ativação deste parece ser necessária para retorno ao uso (Yasuda et al., 2002). Mais importante é o fato do receptor 5HT₂ estar relacionado a desordens de humor na abstinência da nicotina. Zaniewska e colaboradores (2010) mostraram que o tratamento com o antagonista seletivo do receptor 5-HT₂ reverteu o comportamento associado a depressão na retirada da nicotina, diminuindo o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Zaniewska et al, 2010). Deste modo, a supraregulação dos receptores 5-HT₂ pode estar relacionado com a manifestação de comportamentos associados a depressão após longo período de retirada. O balanço da atividade 5HT_{1A} e 5HT₂ pode ser significativo no desfecho da resposta cerebral a abstinência do tabaco, de tal forma que o aumento dos receptores 5HT_{1A} pode ter efeitos positivos sobre possíveis alterações nas manifestações do humor. Estudos futuros que avaliem as alterações de marcação dos receptores de acordo com os tipos celulares e locais de distribuição (pré ou pós sinápticos no caso do 5HT_{1A}) podem gerar uma melhor compreensão das consequências funcionais das alterações observadas aqui.

4.5 Efeitos da exposição ao etanol

Estudos têm demonstrado uma forte relação entre os componentes do sistema serotoninérgico e o consumo de álcool. Uma dessas evidências é o aumento do conteúdo de serotonina após administração aguda de etanol no hipocampo de cérebros de roedores (Brand et al., 2013). Em macacos, a administração crônica de etanol foi capaz de promover a redução da densidade dos transportadores de serotonina (5HTT) (Burnett et al., 2012). De forma semelhante, no presente estudo, animais ETOH machos apresentaram redução da marcação do 5HTT no hipocampo ao final da exposição durante a adolescência. Interessantemente, o “tônus” serotoninérgico parece ser crucial na preferência e manutenção do consumo de etanol (Muller e Homberg, 2015). Esta hipótese foi proposta devido ao fato de animais com alta preferência pelo consumo de etanol possuírem níveis reduzidos de serotonina, metabólito (5-HIAA) e baixa densidade de terminais serotoninérgicos em diversas áreas cerebrais (Zou et al., 1991; 1994; Gongwer et al., 1989). Em estudo recente foi demonstrado que uma deficiência congênita de 5-HTT no cérebro de camundongos está associada com maior consumo de álcool e maior preferência em teste de escolha com 2 garrafas (Sachs et al., 2014). Considerando que essas condições podem predispor o uso de etanol, a redução do 5HTT em machos, observado aqui, pode indicar que estes podem ser mais sensíveis a adquirir comportamentos que levem ao maior consumo. De fato, adolescentes homens possuem maior consumo de etanol e episódios de “binge” mais intensos que mulheres da mesma faixa etária (Wilsnack et al., 2009).

Após 5 dias da última exposição ao etanol, as alterações observadas foram complexas e afetaram distintamente ambos os sexos. Animais ETOH machos apresentam redução do receptor 5HT1A no córtex e no hipocampo e redução da marcação do 5HTT apenas no córtex. Enquanto as fêmeas ETOH apresentam somente redução do receptor 5HT1A no córtex e apresentam redução do 5HTT no hipocampo e no córtex. Vários estudos sugerem um importante papel dos receptores 5-HT1A nos comportamentos associados ao consumo de álcool (McKenzie-Quirk et al., 2003; Tomkins et al., 1994). Por exemplo, os níveis mais baixos de mRNA do receptor 5-HT1A no córtex do cíngulo anterior estão associados com aumento da autoadministração de álcool em macacos (Alexander et al., 2012). Nossos dados indicam que os efeitos da abstinência do etanol variam em função da região cerebral e são dependentes do sexo, sugerindo que as alterações serotoninérgicas após a abstinência podem gerar consequências diferentes entre homens e mulheres. De todo modo, as alterações

observadas em PN50 apontam para redução da atividade serotoninérgica e podem estar associadas a predisposição ao consumo. Após longo período de retirada, os efeitos são revertidos e não observamos mais diferenças em relação aos animais controles. Em acordo, estudos comportamentais prévios do nosso grupo de pesquisa apontam que as alterações observadas são revertidas após 30 dias da última exposição (Abreu-Villaça et al., 2013a; 2013b).

4.6 Efeitos da coexposição

O tabagismo e o consumo de etanol estão comumente associados durante a adolescência. Apesar dos estudos epidemiológicos, pouco se sabe sobre os substratos neurobiológicos que regem esta associação. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa forneceram evidências experimentais de que o sistema colinérgico é um denominador comum na interação da nicotina e do etanol na adolescência, demonstrando mecanismos de associação tanto durante a exposição das drogas, como também, no período de abstinência (Ribeiro-Carvalho et al., 2008; 2009; para revisão ver Abreu-Villaça et al., 2017). Entretanto os efeitos colinérgicos podem gerar alterações em outros sistemas de tal forma que é possível que haja uma grande variedade de possíveis alvos de interação entre a nicotina e o etanol, sendo este fato demonstrado em alguns estudos que indicam esta interação sobre o sistema glutamatérgico, nitrérgico e adenosinérgico (Al-Rejaie e Dar, 2006a,b; Inoue et al., 2007). No presente trabalho, observamos que o sistema serotoninérgico pode representar uma das vias neurotransmissoras que participam dos mecanismos biológicos de interação entre o tabaco e o etanol, podendo ajudar a explicar a forte associação do consumo destas drogas durante a adolescência.

Durante o período de exposição, vimos que a fumaça de cigarro e o etanol isoladamente apresentaram efeitos somente em animais machos, sendo estes efeitos antagônicos. Enquanto que o aumento de terminais serotoninérgicos no hipocampo gerados pelo tabaco pode ser considerado uma resposta adaptativa em machos, a sua redução em animais expostos ao etanol pode ajudar a explicar porque homens consomem mais álcool que fêmeas. No presente estudo, a coexposição possui efeitos aditivos, gerando a reversão destes. Após curto período de retirada, a redução de 5HTT hipocampal observada somente em fêmeas expostas ao etanol ou ao tabaco, também foi observada na coexposição. Além disso,

de forma interessante, foi observada redução da marcação do receptor 5HT1A no córtex cerebral e hipocampo consistentemente em ambos os sexos. Considerando a relevância da redução da função serotoninérgica na abstinência destas drogas (como discutido anteriormente), podemos postular que coexposição estende a ambos os sexos as alterações corticais observadas apenas em um sexo quando há a exposição de apenas uma das drogas isoladamente. Apesar de ser de difícil interpretação este efeito, indica que a coexposição pode levar a padrões de alterações bioquímicas diferentes a observadas nas exposições individuais. De tal modo, reforça a ideia de que é fundamental o estudo das consequências da exposição combinadas de drogas que epidemiologicamente são comumente co-abusadas em humanos.

Após longo período de retirada, animais SMK+ETOH apresentaram aumento da marcação do receptor 5HT2. Este aumento não foi acompanhado do aumento da marcação dos receptores 5HT1A observado nos animais expostos somente a fumaça de cigarro. Desta forma, podemos considerar que a exposição ao etanol durante a adolescência impediu que este efeito ocorresse. Como mencionado anteriormente no tópico de *Interpretação dos biomarcadores*, ambos os receptores podem representar respostas diferentes ao papel funcional da serotonina no córtex cerebral. Ambos os receptores são abundantemente expressos em neurônios piramidais do córtex pré-frontal. A interação funcional entre ambos os receptores pode ser explicada pelo alto grau de co-expressão (quase 80%) nas mesmas populações neuronais (Amargós-Bosch et al., 2004). A ativação farmacológica dos receptores 5-HT2A resulta em um aumento geral da atividade piramidal, enquanto que dos receptores 5-HT1A inibem a atividade piramidal (para revisão ver Celada et al., 2004). Estes neurônios projetam para a área tegmental ventral e controlam a atividade de neurônios dopaminérgicos. O aumento da expressão de 5HT2 pode ter consequências negativas sobre as vias de recompensa e na geração do humor. Da mesma forma, esta supregulação pode reduzir a resposta terapêutica de antidepressivos inibidores seletivos para recaptação de serotonina. De fato, tem se relatado mais sucesso no tratamento de abandono do tabagismo o uso de antidepressivos atípicos da classe de inibidores da recaptação de noradrenalina-dopamina (IRND), como a bupropiona (Hughes et al., 2014). No mesmo sentido, tem se sugerido o uso de fármacos antipsicóticos atípicos, que são antagonistas dos receptores 5-HT2A, em pacientes resistentes ao tratamento com inibidores da recaptação de serotonina (Celada et al., 2004).

CONCLUSÕES

O presente trabalho indica que o sistema serotoninérgico cerebral é afetado pela exposição ao tabaco e/ou ao etanol durante a adolescência, assim como também apresentam repercussões durante os períodos de retirada. A marcação do 5HTT em animais PN45 é afetada de maneira distinta a exposição do tabaco ou a do etanol, mas não a dupla exposição, o que pode indicar um efeito balanceador. Em PN50 as alterações observadas na marcação dos ligantes para 5HT1A ou 5HTT variaram de acordo com a região cerebral, sexo ou a ambos. Já em PN75 boa parte das alterações observadas nos períodos anteriores para o 5HT1A e 5HTT cessam, mas não para o 5HT2, indicando assim um efeito tardio da exposição a fumaça de cigarro ou a fumaça+etanol. Dessa maneira no presente estudo, observamos que a coexposição pode gerar interações complexas que dependem da região cerebral e do curso temporal (exposição x retirada), e possuir respostas que podem intensificar os efeitos isolados, reverter alterações e até mesmo gerar consequências inversas.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Villaça Y, Manhães AC, Krahe TE, Filgueiras CC, Ribeiro-Carvalho A. Tobacco and alcohol use during adolescence: Interactive mechanisms in animal models. *Biochem Pharmacol.* 2017 Nov 15;144:1-17.
- Abreu-Villaça Y, Correa-Santos M, Dutra-Tavares AC, Paes-Branco D, Nunes-Freitas A, Manhães AC, Filgueiras CC, Ribeiro-Carvalho A. A ten fold reduction of nicotine yield in tobacco smoke does not spare the central cholinergic system in adolescent mice. *Int J Dev Neurosci.* 2016.
- Abreu-Villaça Y1, Filgueiras CC, Correa-Santos M, Cavina CC, Naiff VF, Krahe TE, Manhães AC, Ribeiro-Carvalho A. Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2015 May;232(10):1693-703.
- Abreu-Villaça Y, de Carvalho Graça AC, Ribeiro-Carvalho A, Naiff Vde F, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nicotine Tob Res.* 2013a Jul;15(7):1211-21
- Abreu-Villaça Y, Cavina CC, Ribeiro-Carvalho A, Correa-Santos M, Naiff VF, Filgueiras CC, Manhães AC. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol during adolescence leads to short- and long-term modulation of anxiety-like behavior. *Drug Alcohol Depend.* 2013b Nov 1;133(1):52-60.
- Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C.C., Guthierrez, M., Medeiros, A.H., Mattos, M.A., Pereira, Mdos S., Manhães, A.C., Kubrusly, R.C., 2010. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine Tob. Res.* 12, 776-780.
- Abreu-Villaça, Y., Nunes, F., Queiroz-Gomes, F. do E., Manhães, A.C., Filgueiras, C.C., 2008. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 33, 599-610.
- Abreu-Villaça, Y., Medeiros, A.H., Lima, C.S., Faria, F.P., Filgueiras, C.C., Manhães, A.C., 2007. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. *Behav.*
- Abreu-Villaça Y, Seidler F, Slotkin TA. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology*, 29: 1440–1450, 2004.
- Abreu-Villaça Y et al., Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Neuropsychopharmacology*, 28: 1935-1949, 2003a.

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*, 97: 114-128, 2003b.

Adam T., Mitschke S., Streibel T., Baker R.R., Zimmermann R. Quantitative Puff-by-Puff-Resolved Characterization of Selected Toxic Compounds in Cigarette Mainstream Smoke. *Chem. Res. Toxicol.*, 2006; 19, 511-520

Adell A, Bortolozzi A, Diaz-Mataix L, Santana N, Celada P, Artigas F. Serotonin interaction with other neurotransmitter systems. In: Müller CP, Jacobs BL, editors. *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*. London: Academic Press; 2010. p. 259–76.

Adriani W et al. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology*, 29: 869-878, 2004.

Adriani W, Chiarotti F, Laviola G. Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behavioral Neuroscience*, 112: 1152-1166, 1998.

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

Adriani W, Laviola G. Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice. *Behavioral Neuroscience*, 117: 695-703, 2003.

Aghajanian, G.K., Sanders-Bush, E. Serotonin, in *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. Davis, KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, pp. 15-34.

Alexander GM, Graef JD, Hammarback JA, Nordskog BK, Burnett EJ, Daunais JB, et al. Disruptions in serotonergic regulation of cortical glutamate release in primate insular cortex in response to chronic ethanol and nursery rearing. *Neuroscience* 2012; 207: 167–81.

Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, et al. Co-expression and in vivo interaction of serotonin 1A and serotonin 2A receptors in prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2004; 14: 281-99.

Anwer J, DAR MS. In vivo effects of (-)-nicotine on ethanol-induced increase in glucose utilization in the mouse cerebellum. *Brain Res Bull.*, 36: 343-348, 1995.

Araújo J.A., et al. Diretrizes para cessação do tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2004; 30 (Supl 2).

Balbani A.P.S., Montovani J.C. Methods for smoking cessation and treatment of nicotine dependence. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, 2005; V.17, n.6, 820-7, nov./dez.

Barron S et al. Adolescent vulnerabilities to chronic alcohol or nicotine exposure: findings from rodent models. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 29: 1720-5, 2005.

- Batel P., Pessione F., Maitre C., Rueff B. Relationship between alcohol and tobacco dependencies among alcoholics who smoke. 1995; *Addiction* 90, 977-980.
- Benowitz N.L. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med. Clin. North Am.* 1992; 76:415-437.
- Bien T.H., Burge R. Smoking and drinking: a review of the literature. *Int J Addict* 1990; 25:1429-1454.
- Brand I, Fliegel S, Spanagel R, Noori HR. Global ethanol-induced enhancements of monoaminergic neurotransmission: a meta-analysis study. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013 Dec;37(12):2048-57.
- Braun A.R., Heinz A.D., Veilleux J.C., Conrad M., Weber S., Wardle M., Greenstein J., Evatt D., Drobos D., Kassel J.D. The separate and combined effects of alcohol and nicotine on anticipatory anxiety: A multidimensional analysis. *Addictive Behaviors*, 2012; 37:485-491.
- Bruijnzeel, A.W., 2012. Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36(5),1418-1441.
- Burke A.R., Miczek K.A., Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis *Psychopharmacology*, 231 (8) (2014), pp. 1557-1580
- Burling TA, Ziff DC. Tobacco smoking: a comparison between alcohol and drug abuse inpatients. *Addictive behaviors*, 13: 185-190, 1988.
- Burnett EJ, Davenport AT, Grant KA, Friedman DP. The effects of chronic ethanol self-administration on hippocampal serotonin transporter density in monkeys. *Front Psychiatry* 2012;3:38.
- Carmody TP *et al.* Co-occurrent use of cigarettes, alcohol, and coffee in healthy, community-living men and women. *Health psychology*, 4: 323-335, 1985.
- 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.*, 86: 200-208, 2007.
- Casey B.J., Jones R.M., Somerville L.H., Braking and accelerating of the adolescent brain *J. Res. Adolescence*, 21 (1) (2011), pp. 21-33
- Cassel JC. Experimental studies on the role (s) of serotonin in learning and memory functions. In: Müller CP, Jacobs BL, editors. *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*. London: Academic Press; 2010. p. 429-47.
- Chen J, Millar WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep.*, 9: 39-46, 1998.
- Clark DB, Kirisci L, Tarter RE. Adolescent versus adult onset and the development of substance use disorders in males. *Drug and alcohol dependence*, 49:115-21, 1998.

Conti MA, Frutuoso MAP, Gambardella AMD. Obesity and body dissatisfaction amongst adolescents. *Rec. Nutr., Campinas*, 2005; 18(4):491-497.

Cross S.J., Lotfipour S., Leslie F.M., Mechanisms and genetic factors underlying co-use of nicotine and alcohol or other drugs of abuse, *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse* (2017) 1-15.

CROWLEY TJ *et al.* Drug and alcohol abuse among psychiatric admissions. A multidrug clinical-toxicologic study. *Archives of general psychiatry*, 30:13-20, 1974.

Dackis C, O'Brien C. Neurobiology of addiction: Treatment and public policy ramifications. *Nat Neurosci*; 2005; 8:1431-40.

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

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

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

Dar MS, Bowman ER, Li C. Intracerebellar nicotinic-cholinergic participation in the cerebellar adenosinergic modulation of ethanol-induced motor incoordination in mice. *Brain Res.*, 644:117-127, 1994.

Davidson C, Lee TH, Xiong Z, Ellinwood EH. Ondansetron given in the acute withdrawal from a repeated cocaine sensitization dosing regimen reverses the expression of sensitization and inhibits self-administration. *Neuropsychopharmacology* 2002;27:542-53.

Davis, K.L., Charney, D., Coyle, J.T., Nemeroff, C. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

Dawson, D.A., 2000. Drinking as a risk factor for sustained smoking. *Drug Alcohol Depend.* 59, 235-249.

DE Fiebre CM, Collins AC. A comparison of the development of tolerance to ethanol and cross-tolerance to nicotine after chronic ethanol treatment in long- and short-sleep mice. *J Pharmacol Exp Ther.*, 266:1398-1406, 1993.

Di Chiara G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend* 1995;38:95-137.

DiFranza J.R., Rigotti N.A., McNeill A.D., Ockene J.K., Savageau J.A., St Cyr D., Coleman M. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tob Control*, 200; 9:313-319.

DiFranza, J.R., Guerrera, M.P., 1990. Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol.* 51, 130-135.

Donovan J.E., Leech S.L., Zucker R.A., Loveland-Cherry C.J., Jester J.M., Fitzgerald H.E., et al. Really underage drinkers: Alcohol use among elementary students. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 2004; 28(2), 341-349.

Duke University Medical Center. Early nicotine use may lead to lasting addiction, study finds. *ScienceDaily*. September 10, 2003. Available at: <http://www.sciencedaily.com/releases/2003/09/030910073801.htm>

Duncan SC *et al.* Adolescent alcohol use development and young adult outcomes. *Drug and alcohol dependence*, 49:39-48, 1997.

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

Ellickson, P.L., Tucker, J.S., Klein, D.J., 2003. Ten-year prospective study of public health problems associated with early drinking. *Pediatrics* 111, 949-955.

Eshel N, Nelson EE, Blair RJ, Pine DS, Ernst M. Neural substrates of choice selection in adults and adolescents: development of the ventrolateral prefrontal and anterior cingulate cortices. *Neuropsychologia*, 2007; 45(6):1270-1279.

Falk D., Yi, H., Hiller-Sturmhöfel S., An epidemiologic analysis of co-occurring alcohol and tobacco use and disorders: findings from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions, *Alcohol Res Health* 29(3) (2006) 162-171.

Flores CM *et al.* A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits and is upregulated by chronic nicotine treatment. *Mol. Pharmacol.*, 41: 31–37, 1992.

Galduróz J.C.F., Caetano R. Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 2004; 26 (S1): 3-6.

Galván, A.; Hare, T.; Parra, C.; Penn, J.; Voss, H.; Glover, G.; Casey, B. Earlier development of the accumbens relative to orbitofrontal cortex might underlie risk-taking behavior in adolescents. *J. Neurosci.*, 26, pp. 6885-6892. 2006.

Gilbert, D.G., Robinson, J.H., Chamberlin, C.L., Spielberger, C.D., 1989. Effects of smoking/nicotine on anxiety, heart rate, and lateralization of EEG during a stressful movie. *Psychophysiology* 26, 311-320.

Gongwer MA, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. Regional brain contents of serotonin, dopamine and their metabolites in the selectively bred high- and low-alcohol drinking lines of rats. *Alcohol* 1989;6:317–20.

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

Grant B.F., Hasin D.S., Chou S., Stinson F.S., Dawson D.A., Nicotine dependence and psychiatric disorders in the United States: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions, *Archives of General Psychiatry* 61(11) (2004) 1107-1115.

- Grant BF, Dawson DA. Age at on set of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse and dependence: Results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Subst Abuse*, 1997; 9:103-10.
- Hall H, Lundkvist C, Halldin C, Farde L, Pike VW, McCarron JA, et al. Autoradiographic localization of 5-HT_{1A} receptors in the post-mortem human brain using [³H]WAY 100635 and [¹¹C]way-100635. *Brain Res* 1997;745:96–108.
- Hannigan JH, Armant DR. Alcohol in pregnancy and neonatal outcome. *Seminars in Neonatology*, 5: 243-54, 2000.
- HAPPE HK, MURRIN LC. High-affinity choline transport sites: use of [³H]hemicholinium-3 as a quantitative marker. *J Neurochem.*, 60: 1191-1201, 1994.
- Heilig, M., Egli, M., Crabbe, J.C., Becker, H.C., 2010. Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked? *Addict. Biol.* 15, 169-184.
- Hevner R.F., Haydar T.F., The (Not Necessarily) convoluted role of basal radial glia in cortical neurogenesis, cerebral cortex (New York, NY) 22(2) (2012) 465–468.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71:533–54.
- Hoyer D, Martin G. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* 1997;36:419–28.
- Hughes JR, Stead LF, Hartmann-Boyce J, Cahill K, Lancaster T. Antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jan 8;(1):CD000031.
- Hughes, J.R., Stead, L.F., Lancaster, T., 2000. Anxiolytics for smoking cessation. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD002849.
- Johnson L.D., O'Malley P.M., Bachman J.G., Schulenberg J.E. Monitoring the future national results on adolescent drug use: overview of key findings, 2008. Bethesda: National Institute on Drug Abuse.
- Johnson P.B., Boles S.M., Vaughan R., Kleber H.D. The co-occurrence of smoking and binge drinking in adolescence, *Addictive Behaviors* 25(5) (2000) 779-783.
- 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*, 53:447-457, 1992.
- Kennett GA, Dourish CT, Curzon G (1987). Antidepressant-like action of 5-HT_{1A} agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. *Eur. J. Pharmacol.* 134 (3): 265–74. doi:10.1016/0014-2999(87)90357-8.
- King A.C., Epstein A.M., Alcohol Dose–Dependent Increases in Smoking Urge in Light Smokers, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 29(4) (2005) 547-552.
- Kleijan M., Vitaro F., Wanner B., Brug J., Van den Eijnden R.J.J.M, Engels R.C.M.E. Predicting nicotine dependence profiles among adolescent smoker: the roles of personal and

social-environmental factors in a longitudinal framework. *BMC Public Health*, 2012; 12:196.

Koob GF *et al.* Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22:3-9, 1998.

Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 1997;278:52–8.

Koob GF. Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder. *Front Psychiatry* 2013;4:72.

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

Larsson, A., Engel, J.A., 2004. Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 713-720.

Le AD *et al.* Involvement of nicotinic receptors in alcohol self-administration. *Alcohol Clinical Exp Research*, 24: 155-163, 2000.

Lee MD, Clifton PG. Role of the serotonergic system in appetite and ingestion control. In: Müller CP, Jacobs BL, editors. *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*. London: Academic Press; 2010. p. 331–45.

Lesch, K.P., Balling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B.L., Murphy, D.L., Riederer, P. (1994) *J. Neural. Transm. Gen. Sect.*, 95(2), 157-62.

Lewis, DA. Development of the prefrontal cortex during adolescence: Insights into vulnerable neural circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 16: 385-398, 1997.

López-Giménez, J.F., Mengod, G., Palacios, J.M. and Vilaró, M.T. (1997) Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [³H]MDL 100,907. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 356: 446 – 454.

López-Giménez, J.F., Villazon, M., Brea, J., Loza, M.I., Palacios, J.M., Mengod, G. and Vilaró, M.T. (2001a) Multiple conformations of native and recombinant human 5-hydroxytryptamine(2a) receptors are labelled by agonists and discriminated by antagonists. *Mol. Pharmacol.*, 60: 690 – 699.

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

Macri's *et al.* Risk-taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Animal Behavior*, 64: 541-46, 2002.

Mansvelder H.D., Keith J.R., McGehee D.S., Synaptic Mechanisms Underlie Nicotine-Induced Excitability of Brain Reward Areas, *Neuron* 33(6) (2002) 905-919.

Mansvelder HD, McGehee D. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *Journal of Neurobiology*, 53: 606-617, 2002.

Martin CA, Kelly TH, Rayens MK, Brogli BR, Brenzel A, Smith WJ, et al. Sensation seeking, puberty, and nicotine alcohol, and marijuana use in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2002; 41:1495-502.

McBride WJ. Role of serotonin in brain reward and regulation of alcohol drink-ing behavior. In: Müller CP, Jacobs BL, editors. *Handbook of the behavioralneurobiology of serotonin*. London: Academic Press; 2010. p. 399–414.

McGinnis JM, Foege WH.. Actual causes of death in the United States. *Journal of the American Medical Association*, 270: 2207– 2212, 1993.

McKenzie-Quirk SD, Miczek KA. 5-HT1A agonists: alcohol drinking in rats and squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;167:145–52.

Meneses A, Perez-Garcia G. 5-HT1A receptors and memory. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:705–27.

Meyerhoff, D.J., Tizabi, Y., Staley, J.K., Durazzo, T.C., Glass, J.M., Nixon, S.J., 2006. Smoking comorbidity in alcoholism: neurobiological and neurocognitive consequences. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 30, 253-264.

Mitchell SH. Measures of impulsivity in cigarette smokers and non-smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, 146: 455-464, 1999.

Molnár Z, Kaas J.H., de Carlos J.A., Hevner R.F., Lein E., Němec P., Evolution and development of the mammalian cerebral cortex

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*, 57: 253-259, 1996.

Müller C.P., Homberg J.R. The role of serotonin in drug use and addiction *Behavioural Brain Research* 277 (2015) 146–192

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

Neso A.S.M., Cruz Á.A. Smoking among school adolescents in Salvador (BA). *J Pneumol*, 2003; 26(5): 264-72.

Nonkes LJ, Homberg JR. Perseverative instrumental and Pavlovian respon-ding to conditioned stimuli in serotonin transporter knockout rats. *Neurobiol Learn Mem* 2013;100:48–55.

NSDUH, Results from the 2013 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings, in: S.A.a.M.H.S.A. US Dept' of Health and Human Services(Ed.)[https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUHresultsPDFWHTML2013/We b/NSDUHresults2013.pdf](https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUHresultsPDFWHTML2013/We%20b/NSDUHresults2013.pdf), 2013.

O'Leary OF, Cryan JF. The behavioral genetics of serotonin: relevance to anxiety and depression. In: Müller CP, Jacobs BL, editors. Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin. London: Academic Press; 2010. p. 749–89.

O'Loughlin J.O., DiFranza J., Tyndale R.F., Meshefedjian G, McMillan-Davey E., Clarke P., Hanley J., Paradis G. Nicotine-dependence symptoms are associated with smoking frequency in adolescents. *Am J Prev Med*, 2003; 25:2019-225.

Ogren S.O., Eriksson T.M., Elvander-Tottie E., D'Addario C, Ekström J C., Svenningsson P, Meister B., Kehr J., Stiedl O. The role of 5-HT1A receptors in learning and memory. *Behavioural Brain Research* 195 (2008) 54–77

Oliveira-da-Silva A., Manhães A.C., Cristina-Rodrigues F., Filgueiras C.C., AbreuVillça Y. Hippocampal increased cell death and decreased cell density elicited by nicotine and/or ethanol during adolescence are reversed during drug withdrawal, *Neuroscience* 167(1) (2010) 163-173.

Oliveira-da-Silva A., Vieira F.B., Cristina-Rodrigues F., Filgueiras C.C., Manhães A.C., Abreu-Villça Y. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2009; 27:539-548.

Olivier, B. 2015. Serotonin: a never-ending story. *Eur J Pharmacol.*; 753:2-18.

Oquendo, M.A., Placidi, G.P., Malone, K.M., Campbell, C., Keilp, J., Brodsky, B., Kegeles, L.S., Cooper, T.B., Parsey, R.V., van Heertum, R.L., Mann, J.J. (2003) *Arch. Gen. Psychiatr.*, 60(1), 14-22.

Organização Pan-americana da Saude (OPAS)/Organização Mundial da Saúde (OMS). Dia mundial sem tabaco-Aumento de Impostos como Medida para Redução do Consumo de Tabaco. 2014

Organização Panamericana de Saúde (OPS) - Banco Mundial. La epidemia del tabaquismo. Publicación científica 2000; N° 577

Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (18): 10734–9. doi:10.1073/pnas.95.18.10734. PMC 27964 Freely accessible.

Patton, G.C. et al (2009). Global patterns of mortality in young people: a systematic analysis of population health data. *Lancet*, 2009; 374, 881-892

Pazos , A. , Probst , A. and Palacios , J.M. (1987 b) Serotonin receptors in the human brain – IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors . *Neuroscience* , 21 : 123 – 139 .

Pazos A, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 1985;346:205–30.

Picciotto MR *et al.* It is not either/orq: activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Prog. Neurobiol.*, 84: 329–342, 2008.

Picciotto, M.R., Brunzell, D.H., Caldarone, B.J., 2002. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport* 13, 1097-1106.

Pickard H. The purpose in chronic addiction. *AJOB Neurosci* 2012;3:40–9.

Pierce JP, Gilpin E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *American Journal of Public Health*, 86: 253-256, 1996.

Placzek AN, Zhang Ta, Dani JA. Age dependent nicotinic influences over dopamine neuron synaptic plasticity. *Biochem Pharmacol*, 2009; 78:686-92.

Poulos CX, Parker JL, Le DA. Increased impulsivity after injected alcohol predicts later alcohol consumption in rats: evidence for "loss-of-control drinking" and marked individual differences. *Behavioral Neuroscience*, 112: 1247-57, 1998.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. *Pharmacology* (V ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003.

Research Society on Alcoholism. *Impact of alcoholism and alcohol induced disease on America*. Research Society on Alcoholism, Austin, TX, 2009.

Rezvani AH, Levin ED. Nicotine-alcohol interactions and cognitive function in rats. *Pharmacology, biochemistry and behaviour*, 72: 865-872, 2002.

Riala K., Hakko H., Isohanni M., Järvelin M.-R., Räsänen P., Teenage smoking and substance use as predictors of severe alcohol problems in late adolescence and in young adulthood, *Journal of Adolescent Health* 35(3) (2004) 245-254.

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

Ribeiro-Carvalho, A., Lima, C.S., Medeiros, A.H., Siqueira, N.R., Filgueiras, C.C., Manhães, A.C., Abreu-Villaça, Y., 2009. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long-term withdrawal. *Neuroscience* 162, 1174-1186.

Robbins TW, Everitt BJ. Drug addiction: bad habits add up. *Nature* 1999;398:567–70.

Robinson TE, Berridge KC. *Addict Ann Rev Psychol* 2003;54:25–53.

Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 1993;18:247–91.

Rose J.E., Brauer L.H., Behm F.M., Cramblett M., Calkins K., Lawhon D., Psychopharmacological interactions between nicotine and ethanol, *Nicotine & Tobacco Research* 6(1) (2004) 133-144

Rose, J.E., 2006. Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. *Psychopharmacology* 184, 274-285.

Saavedra J. M., Brownstein M., Palkovits M.. serotonin distribution in the limbic system of the rat. *Brain Research*, 79 (1974) 437-441 437

Sachs BD, Salahi AA, Caron MG. Congenital brain serotonin deficiency leadsto reduced ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice. *Neuropharmacology* 2014;77:177–84.

Schepis TS, Adinoff B, RAO U. Neurobiological processes in adolescent addictive disorders. *Am J Addict.*, 17: 6-23, 2008.

Semple B.D., Blomgren K., Gimlin K, Ferriero D.M, Noble-Haeusslein L.J, Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species

Serretti A., Calati R., Mandelli L, De Ronchi D. Serotonin Transporter Gene Variants and Behavior: A Comprehensive Review. *Institute of Psychiatry, University of Bologna, Bologna, Italy. Current Drug Targets*, 2006, 7, 1659-1669

Shearman E., Fallon S., Sershen H., Lajtha A., Nicotine-induced monoamine neurotransmitter chages in the brain of young rats. *Brain Res Bull*, 2008; 76(6), 626-639.

Silveri MM, Spear LP. Decreased sensitivity to the hypnotic effects of ethanol early in ontogeny: *Alcohol Clin Exp Res.*, 22: 670–676, 1998.

Slawewski CJ. Comparison of anxiety-like behavior in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. *Behavioral Neuroscience*, 119: 1477-83, 2005.

Slikker W.J., Xu Z.A., Levin E.D., Slotkin T.A. 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, T.A., 2002. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 369-384.

Smith BR *et al.* Exposure to nicotine enhances acquisition of ethanol drinking by laboratory rats in a limited access paradigm. *Pharmacology*, 142: 408-412, 1999.

Spear L.P., Adolescent neurodevelopment, *journal of adolescent health* 52(2, Suppl. 2) (2013) S7–S13.

Spear L.P., Assessment of Adolescent Neurotoxicity: Rationale and Methodological Considerations: An Introduction to the Special Issue on “Risk of neurobehavioral toxicity in adolescence”, *Neurotoxicology and teratology* 29(1) (2007) 1-9.

Spear L.P., The adolescent brain and age-related behavioral manifestations, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24(4) (2000) 417-463.

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, 17:143-59, 2005.

Spear LP. The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *Journal of Study Alcohol Supplement*, 14: 71-81, 2002.

Tomkins DM, Higgins GA, Sellers EM. Low doses of the 5-HT1A agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH DPAT) increase ethanol intake. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;115:173-9.

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

Trauth J.A., McCook E.C., Seidler F.J., Slotkin T.A. Modeling adolescent nicotine exposure: effects on cholinergic systems in rat brain regions. *Brain Res*, 2000a; 873:18-25.

Trauth J.A., Seidler F.J., Ali S.F., Slotkin T.A. Adolescent nicotine exposure produces immediate and long-term changes in CNS noradrenergic and dopaminergic function. *Brain Res*, 2001; 892:269-280

van Enkhuizen, J., Janowsky, D.S., Olivier, B., Minassian, A., Perry, W., Young, J.W., Geyer, M.A. 2015. The catecholaminergic-cholinergic balance hypothesis of bipolar disorder revisited. *Eur J Pharmacol.*;753:114-26.

Villégier, A.S., Gallager, B., Heston, J., Belluzzi, J.D., Leslie, F.M., 2010. Age influences the effects of nicotine and monoamine oxidase inhibition on mood-related behaviors in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 208, 593-601.

Viner R.M, Ozer M.E, Denny, Marmot M, Resnick M, Fatusi A, Currie A. Adolescence and the social determinants of health. *Lancet*, 2012; 379:1641-52.

Volkow ND, Chandler RK, Fletcher BW. Drug addiction as a brain disorder or disease [reply]. *JAMA*, 2009; 301:1881-2.

Volkow ND, Li Tk. The neuroscience of addiction. *Nat Neurosci*, 2005; 8:1429-30.
Weinberger A.H., Pilver C.E., R.A. Hoff, Mazure C.M., McKee S.A. Changes in Smoking for Adults with and without Alcohol and Drug Use Disorders: Longitudinal Evaluation in the U.S. Population, *The American journal of drug and alcohol abuse* 39(3) (2013) 186- 193.

West WB, Van Groll BJ, Appel JB. Stimulus effects of d-amphetamine II: DA,NE, and 5-HT mechanisms. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;51:69-76.

White AM *et al.* Chronic-intermittent ethanol exposure during adolescence prevents normal developmental changes in sensitivity to ethanol-induced motor impairments. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 26: 960-968, 2002.

Whiting P, Lindstrom J. Purification and characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from rat brain. *Proc Natl Acad Sci.*, 84: 595-599, 1987.

World Health Organization (WHO). Global status report on alcohol and health – 2014. Geneva, Switzerland.

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

Yamada, K., Kobayashi, M., Kanda, T. 2014. Involvement of adenosine A2A receptors in depression and anxiety. *Int Rev Neurobiol.* 2014;119:373-93.

Zuckerman M. Smoking, drinking, drugs and eating. In: *Behavioral Expressions and Biosocial Basis of Sensation Seeking*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 225-257, 1994.