

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Dayane Alves Quinteros

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE ÁLCOOL E CIGARRO SOBRE
PARAMETROS NEUROTRÓFICOS, NEUROINFLAMATÓRIOS,
OXIDATIVOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS**

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Dayane Alves Quinteros

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE ÁLCOOL E CIGARRO SOBRE
PARAMETROS NEUROTRÓFICOS, NEUROINFLAMATÓRIOS,
OXIDATIVOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS**

Dissertação apresentada ao instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do **grau de Mestre** em farmacologia e terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Rosane Gomez

Co-Orientador: Prof. Dr. André
Quincozes dos Santos

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Reitor: Rui Vicente Oppermann

Vice-Reitora: Jane Fraga Tutikian

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Diretora Ilma Simoni Brum da Silva

Vice-Diretor: Marcelo Lazzaron Lamers

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Coordenadora: Patricia Pereira

Coordenadora Substituta: Iraci Lucena da Silva Torres

CIP - Catalogação na Publicação

Quinteros, Dayane Alves

Efeito da associação do álcool e cigarro sobre os parâmetros neurotróficos, neuroinflamatórios, oxidativos e comportamentais em ratos / Dayane Alves Quinteros. -- 2017.

89 f.

Orientadora: Rosane Gomez.

Coorientador: André Quincozes dos Santos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Uso de álcool e cigarro. 2. Parâmetros neurotróficos. 3. Parâmetros neuroinflamatórios. 4. Parâmetros oxidativos. 5. Parâmetros comportamentais. I. Gomez, Rosane, orient. II. Santos, André Quincozes dos, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dayane Alves Quinteros

Efeito da associação de álcool e cigarro sobre parâmetros neurotróficos, neuroinflamatórios, oxidativos e comportamentais em ratos.

Dissertação apresentada ao instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em farmacologia e terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Rosane Gomez

Co-Orientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos

Aprovada em 04 de maio de 2017

Banca Examinadora

Prof^a Patricia Pereira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Adriana Simon Coitinho
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Claudia da Silva Funchal
Centro Universitário Metodista IPA

Suplente Prof Regis Adriel Zanett
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório do Álcool e Tabaco, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os resultados desta dissertação de mestrado estão apresentados sob a forma de um artigo científico

Na parte I desta dissertação encontra-se a introdução do trabalho contendo as bases teóricas para o seu entendimento. Na parte II encontra-se o artigo científico denominado "*Combined use of alcohol and cigarette smoke on neurotrophic, inflammatory, and oxidative parameters in different brain areas of rats*". Na parte III encontram-se os resultados complementares, a discussão e conclusões.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Rosane Gomez, pela sua competência na participação de todos os processos da minha formação no presente mestrado, por ter me acompanhado por vários anos, me apoiando e confiando no meu trabalho; por ter me ensinado tudo o que eu sei com relação à pesquisa e principalmente por ser um grande exemplo de profissional para mim. A todos os colaboradores do laboratório de Álcool e Tabaco, pela ajuda, em especial na etapa dos experimentos.

Aos meus pais, Antônio e Neuza, por serem meus maiores exemplos; por sempre me mostrarem os verdadeiros valores de vida, me orientando a fazer as melhores escolhas; por entenderem minha ausência em diversos momentos importantes para eles. Aos meus irmãos Vanessa e Eduardo, pela grande torcida e apoio; pela paciência e por todos os momentos divididos, pelo seu amor e carinho. À minha família, meu muito obrigado e a certeza de que é em vocês que eu encontro toda a minha força.

Agradeço também aos meus amigos e colegas de trabalho, que sempre estiveram ao meu lado me dando força para encarar os desafios; por cada momento dividido, sendo eles bons ou ruim, engraçados ou tristes e que fizeram desta que esta etapa fosse vivida da melhor maneira e com muita alegria.

LISTA DE ABREVIATURAS

Dissertação

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CPF	Córtex pré-frontal
CRP	Proteína C-reativa
DCFH-DA	2'-7'-Diclorofluoresceína diacetato
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutathiona
IL-1β	Interleucina 1 beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
SNC	Sistema nervoso central
ALCS	Grupo álcool e fumaça de cigarro
CS	Grupo fumaça de cigarro
AL	Grupo álcool
CT	Grupo controle

Artigo

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CPF	Córtex pré-frontal
DCFH-DA	2'-7'-dichlorofluorescein diacetate
ROS	Reactive oxygen species
GS	Glutamine synthetase
GSH	Glutathione
IL-1β	Interleukin 1 beta
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha

CNS	Central nervous system
ALCS	Alcohol and cigarette smoke group
CS	Cigarette smoke group
AL	Alcohol group
CT	Control group
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ANOVA	Analysis of variance
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
MRI	Magnetic resonance imaging
CREB	cAMP responsive element binding protein
NFκB	Nuclear factor κB
BBB	Blood–brain barrier
MDA	Malondialdeide

LISTA DE FIGURAS

Figuras apresentadas no corpo da Dissertação

- Figura 1.** Consumo total de álcool *per capita* em 2010 (litros de álcool puro), de indivíduos maiores de 15 anos de idade (Adaptado de OMS, 2010)..... **18**
- Figura 2.** Prevalência global de fumantes entre os anos de 2007 a 2013 de acordo com a distribuição de renda (Adaptado de OMS, 2014)..... **20**
- Figura 3.** Distribuição de doenças com morte associadas ao uso de álcool (Adaptado de OMS, 2014)..... **21**
- Figura 4.** Comparação da estrutura química da acetilcolina e da nicotina. **24**
- Figura 5.** Espécies Reativas da fumaça do cigarro provocam estresse oxidativo e inflamação que levam à disfunção sináptica e neurodegeneração do cérebro (Adaptado de G, 2017). **29**
- Figura 6.** Síntese de glutamato pela ação da enzima glutamato desidrogenase (A), síntese de glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase (B) e hidrólise de glutamina a glutamato pela enzima glutaminase (C). **30**
- Figura 7.** Ganho de peso médio semanal de ratos tratados com álcool (4g/kg/dia), via gavagem, expostos à fumaça de 12 cigarros/dia, via inalatória, ou sua associação, por 28 dias. n = 12/grupo; ANOVA 2 vias de medidas repetidas + Bonferroni. * diferente dos demais grupos na mesma semana, $P < 0,001$; **73**
- Figura 8.** Consumo médio semanal de ração de ratos tratados com álcool (4g/kg/dia), via gavagem, expostos à fumaça de 12 cigarros/dia, via inalatória, ou sua associação, por 28 dias. n = 12/grupo; ANOVA 2 vias de medidas repetidas + Bonferroni. * diferente dos demais grupos na mesma semana, $P < 0,001$ **74**
- Figura 9.** Consumo médio semanal hídrico de ratos tratados com álcool (4g/kg/dia), via gavagem, expostos à fumaça de 12 cigarros/dia, via inalatória, ou sua associação, por 28 dias. . n = 12/grupo; ANOVA 2 vias de medidas repetidas + Bonferroni. **74**

Figuras apresentadas no artigo

Figure 1. Timeline from experimental procedures.....	64
Figure 2. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in different brain areas of rats after alcohol use, cigarette smoke exposure, or their combined use, along 28 day.....	65
Figure 3. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) levels in different brain areas of rats after alcohol use, cigarette smoke exposure, or their combined use, along 28 days.....	66
Figure 4. Interleukin 1 beta (IL-1 β) levels in different brain areas of rats after alcohol use, cigarette smoke exposure, or their combined use, along 28 days.....	67
Figure 5. Reactive oxygen species (ROS) production in different brain areas and serum of rats after alcohol use, cigarette smoke exposure, or their combined use, along 28 days.....	68
Figure 6. Glutathione (GSH) levels in different brain areas and serum of rats after alcohol use, cigarette smoke exposure or their combined use, along 28 days.....	69
Figure 7. Glutamine synthetase (GS) activity in different brain areas of rats after alcohol use, cigarette smoke exposure, or their combined use, along 28 days.....	70
Figure 8. Short-term memory in rats after alcohol use, cigarette smoke exposure, or their combined use, along 28 days.....	71

RESUMO

Álcool e cigarro são drogas de abuso que causam inúmeros malefícios a saúde humana e estão associados a milhões de mortes por ano. No entanto, poucos estudos avaliam o efeito de seu uso combinado. Nosso objetivo foi avaliar o efeito da sua associação sobre parâmetros neurotróficos, neuroinflamatórios, oxidativos e comportamentais de ratos. Ratos Wistar, machos, adultos, foram administrados com veículo ou 2g/kg de álcool, via oral (gavagem). Imediatamente após a administração do álcool, eram colocados em câmaras para exposição ao ar ambiental ou fumaça de 6 cigarros, 2 vezes/dia, por 28 dias. No 26º dia foi realizado o teste de memória (esquiva inibitória) para avaliação da memória de curta duração. No 28º dia, após eutanásia, hipocampo, córtex frontal e estriado foram dissecados para avaliação dos parâmetros neurotróficos e neurotransmissores através do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e glutatona sintetase (GS), neuroinflamatórios pela quantificação das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) e oxidativos pela determinação de glutatona (GSH) e diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Sangue troncular foi coletado para determinação de espécies reativas. Comportamento alimentar e hídrico, bem como variação de peso também foram monitorados. Nossos resultados mostram que os parâmetros neurotróficos, inflamatório e oxidativo variam de acordo com a área encefálica e tipo de tratamento. O uso combinado de álcool e fumaça de cigarro diminuiu BDNF e aumentou IL-1 β nas três áreas encefálicas, enquanto TNF- α aumentou no estriado e córtex frontal. Aumento das espécies reativas foi detectado apenas no hipocampo. Memória de curta duração não foi afetada. Os animais expostos à fumaça de cigarro ganharam menos peso e reduziram a ingestão de ração. Portanto, a associação entre álcool e cigarro potencializa mecanismos neurodegenerativos no encéfalo de ratos, representando maior risco para a saúde humana do que seu uso isolado.

ABSTRACT

Alcohol and cigarettes are drugs of abuse that cause innumerable human health hazards and are associated with millions of deaths each year. However, few studies evaluate the effect of their combined use. Our objective was to evaluate the effect of its association on neurotrophic, neuroinflammatory, oxidative and behavioral parameters of rats. Adult male Wistar rats were given either vehicle or 2 g/kg alcohol via oral (gavage). Immediately after administration of the alcohol, they were placed in chambers for exposure to ambient air or 6 cigarette smoke, twice a day, for 28 days. On the 26th day, the memory test (inhibitory avoidance) was performed to evaluate short-term memory. On the 28th day, after euthanasia, hippocampus, frontal cortex and striatum were dissected to evaluate the neurotrophic parameters and neurotransmitters through brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glutathione synthetase (GS), neuroinflammatory by the quantification of cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1 beta (IL-1 β) and oxidative by determination of glutathione (GSH) and dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Trunk blood was collected for determination of free radicals. Food and water behavior, as well as weight variation were also monitored. Our results show that the neurotrophic, inflammatory and oxidative parameters vary according to the encephalic area and type of treatment. The combined use of alcohol and cigarette smoke decreased BDNF and increased IL-1 β in the three encephalic areas, while TNF- α increased in the striatum and frontal cortex. Increased reactive species was detected only in the hippocampus. Short-term memory was not affected. The animals exposed to cigarette smoke gained less weight and reduced feed intake. Therefore, the association between alcohol and cigarette smoking potentiates neurodegenerative mechanisms in the brain of rats, representing a greater risk for human health than its isolated use.

SUMÁRIO

PARTE I

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	17
2.1.GERAL	17
2.2.ESPECÍFICOS.....	17
3. REVISAO DA LITERATURA.....	17
3.1.EPIDEMIOLOGIA DO ALCOOLISMO E DO TABAGISMO.....	18
3.2.IMPLICAÇÕES DO USO DE ÁLCOOL, CIGARRO E SUA ASSOCIAÇÃO	21
3.3.NEUROBIOLOGIA DO ALCOOLISMO E DO TABAGISMO	23
3.4.EFEITO DO ALCOOLISMO E TABAGISMO, SOBRE A MEMÓRIA	24
3.5.INFLUÊNCIA DO ALCOOLISMO E TABAGISMO NOS NÍVEIS DE BDNF	25
3.6.USO DE ÁLCOOL E CIGARRO E A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS.	27
3.7.ALCOOLISMO, TABAGISMO E NEUROINFLAMAÇÃO.....	28
3.8.GLUTAMATO E USO DE ÁLCOOL E CIGARRO	29

PARTE II

ARTIGO	32
---------------------	-----------

PARTE III

4. RESULTADOS COMPLEMENTARES	73
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS	78
ANEXO A.....	89

1. INTRODUÇÃO

Álcool e cigarro são drogas lícitas, amplamente utilizadas e comercializadas, com uso estimulado importantemente pela mídia. O uso abusivo de cada uma delas está associado a inúmeras doenças e, no caso do álcool, ao aumento da criminalidade, acidentes de trânsito e de trabalho (OMS, 2014, 2016). Consumo abusivo de álcool está relacionado a mais de 60 diferentes tipos de doença e juntamente com a violência e acidentes de trânsito, totalizam mais de 3,3 milhões de mortes anualmente (OMS, 2014). Uso crônico de cigarro, por outro lado, também está associado a inúmeras doenças e a mais de 6 milhões de mortes anualmente (OMS, 2016). De fato, 12% de todas as mortes de indivíduos maiores de 30 anos podem ser atribuídas ao cigarro (OMS, 2016). Apesar dessas estatísticas alarmantes, há poucos estudos avaliando as consequências do uso concomitante de álcool e do cigarro, embora se saiba que mais de 90% dos indivíduos dependentes de álcool são fumantes e que alcoolistas pesados fumam mais que indivíduos não alcoolistas (Meyerhoff, et al., 2006).

Embora não haja justificativa para a elevada frequência do uso combinado do álcool e do cigarro, alguns pesquisadores sugerem que, por serem drogas lícitas, sua venda livre aumenta naturalmente o risco de abuso e dependência por indivíduos compulsivos ou predispostos à dependência (Falk et al., 2006; Little, 2000). Outros sugerem o envolvimento de mecanismos farmacológicos devido a contraposição dos seus efeitos, uma vez que, enquanto a nicotina aumenta o estado de alerta, o álcool promove perda do controle motor e aumento do tempo de reação (Room, 2004; Rose et al., 2004). Portanto, o uso associado reduziria sinais de intoxicação, prolongando os efeitos prazerosos. Não se descarta que o uso concomitante também apresente efeito sinérgico, não só prolongando o prazer, como também o intensificando (Little, 2000; Rose et al., 2004). Não se descarta ainda que susceptibilidade genética, comum entre álcool e cigarro, poderia explicar comorbidade (Howard et al., 2003).

Embora muitos estudos avaliem os efeitos danosos aos tecidos, bem como alterações comportamentais e de memória resultantes do uso isolado de cada uma das drogas, poucos exploram os efeitos do uso combinado entre álcool e cigarro. Estudar os efeitos da associação entre álcool e cigarro sobre os tecidos, bem como

desvendar os mecanismos resultantes de sua ação combinada é importante para o estabelecimento de estratégias para prevenção de dano, controle do uso, redução de síndrome de abstinência e risco de recaída.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o efeito da associação da exposição crônica à fumaça do cigarro e ao álcool sobre parâmetros oxidativo, neuroinflamatórios, neurotróficos e comportamentais em ratos.

2.2. Específicos

Avaliar o efeito da exposição crônica ao álcool, à fumaça do cigarro ou sua associação sobre:

- Parâmetros oxidativos no hipocampo (DCFH-DA e GSH), estriado, córtex frontal e soro de ratos;
- Atividade da enzima glutamina sintetase no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos;
- Parâmetros neuroinflamatórios (TNF- α e IL-1 β) no hipocampo, estriado e córtex frontal de ratos;
- Parâmetros neurotróficos (BDNF) no hipocampo, estriado e córtex frontal de ratos;
- Memória de curta-duração em ratos;
- Comportamento alimentar, hídrico e controle de peso em ratos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Epidemiologia do alcoolismo e do tabagismo

Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que mais de 2 bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas no mundo, correspondendo a aproximadamente 40% da população, ou seja, 2 em cada 5 pessoas (OMS, 2014). Seu consumo está associado a mais de 3,3 milhões de morte por ano, representando 5,9% do total de mortes/ano por qualquer causa (OMS, 2014). É fator causal de mais de 200 condições médicas, incluindo doenças psiquiátricas ou incapacidade relacionada a acidentes de trabalho ou trânsito. Estes e outros fatores estão associados a prejuízo não apenas para o usuário, mas também para a sociedade com importante impacto econômico e social.

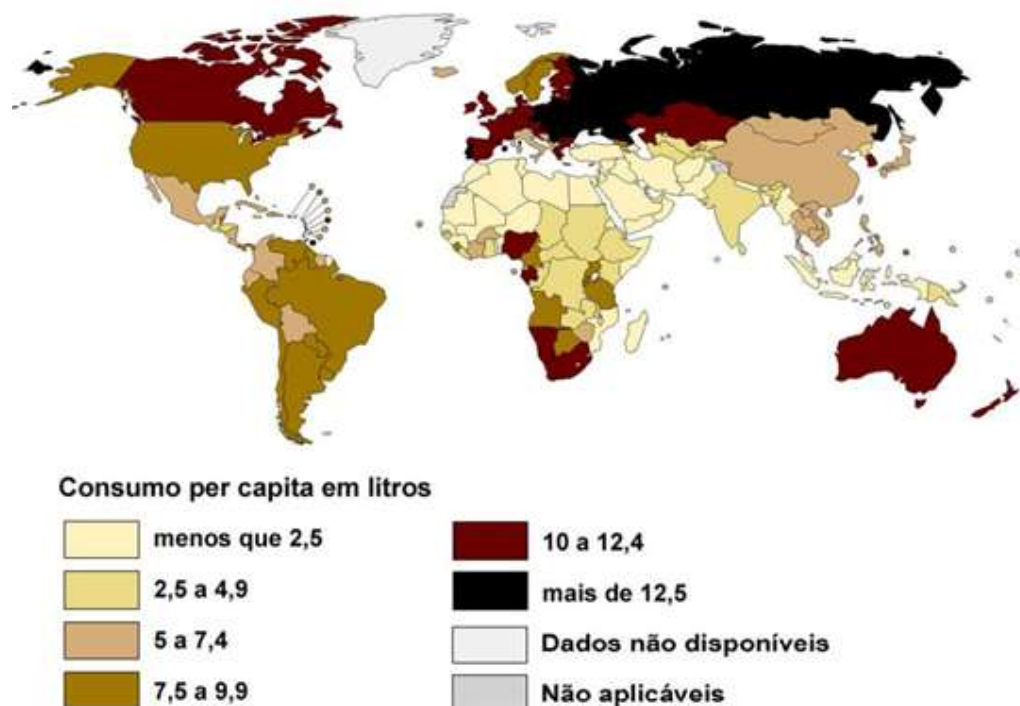


Figura 1. Consumo total de álcool *per capita* em 2010 (litros de álcool puro), de indivíduos maiores de 15 anos de idade (Adaptado de OMS, 2010).

O uso de álcool inicia-se ainda na infância ou adolescência, com prevalência na idade entre 15 a 19 anos, com maior consumo na Região Europeia, Américas e

Pacífico Ocidental, como mostrado na Figura 1. O consumo global entre maiores de 15 anos de idade no ano de 2010 era de cerca de 6,2 litros de álcool puro/ano, equivalente a 13,5g de álcool por dia (OMS, 2014). Além disso, dados da OMS revelam que homens consomem cerca de 3 vezes mais álcool (16,8%) do que mulheres (6,2%). Globalmente, as bebidas destiladas são as mais consumidas (50%), seguidas das fermentadas como cerveja (35%). No entanto, nas Américas, incluindo o Brasil, a bebida mais consumida é a cerveja (55%), seguida de destilados (32,6%) e vinho (11,7%) (OMS, 2014).

No Brasil, o consumo total estimado de álcool é maior que o mundial e equivalente a 8,7L de álcool por pessoa no ano de 2010, com homens consumindo 2,2 vezes mais álcool (19,6 L/ano) do que mulheres (8,9 L/ano) (OMS, 2014). Embora apresente consumo elevado de álcool, verifica-se diminuição de cerca de 11% no consumo *per capita* de álcool puro no Brasil entre 2005 (9,8L) e 2010 (8,7L) (OMS, 2014). Aqui a prevalências de consumo de álcool é maior em adultos jovens, afrodescendentes ou indígenas, fumantes, ou pessoas que avaliaram sua saúde como boa ou muito boa (Garcia e Freitas, 2015). Prevalência menor foi observada entre indivíduos sem instrução ou com ensino fundamental incompleto e entre aqueles que referiram morbidades (Garcia e Freitas, 2015). Quanto ao local de residência, prevalências mais expressivas eram de moradores de zonas urbanas, nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, sendo que a região Sul apresentava menores índices de consumo (Garcia e Freitas, 2015).

Com relação ao cigarro e seus derivados, a OMS mostra que mais de 1 bilhão de pessoas são usuárias, consumindo cerca de 6 trilhões de cigarros por ano (OMS, 2016). Prevalência de consumo é maior na Ásia, África e Oriente Médio, com menor extensão na Europa e Américas. Uso crônico está associado a mais de 6 milhões de mortes por ano, com projeção de mais de 8 milhões mortes para o ano 2030, representando 10% do total de mortes por qualquer causa. Destas, mais de 600.000 estão associadas à morte prematura por exposição passiva à fumaça do cigarro (OMS, 2016). Atualmente, o tabagismo é responsável por 63% dos óbitos relacionados com doenças crônicas não transmissíveis, como doença pulmonar crônica (85%), diversos tipos de câncer (30%), doença coronariana (25%) e acidente vascular encefálico (25%). Fumar também é importante fator de risco para doenças transmissíveis como tuberculose e infecções do trato respiratório

inferior(OMS,2016). Em todas as regiões, homens fumavam mais que mulheres, com menor disparidade nas Américas, onde os homens fumam cerca de 1,5 vezes mais do que as mulheres (INCA, 2011; OMS, 2016). A prevalência de fumantes entre os anos 2007 e 2013 (Figura 2) mostra redução do consumo, embora aumento da população projete aumento do número de fumantes nos próximos anos.

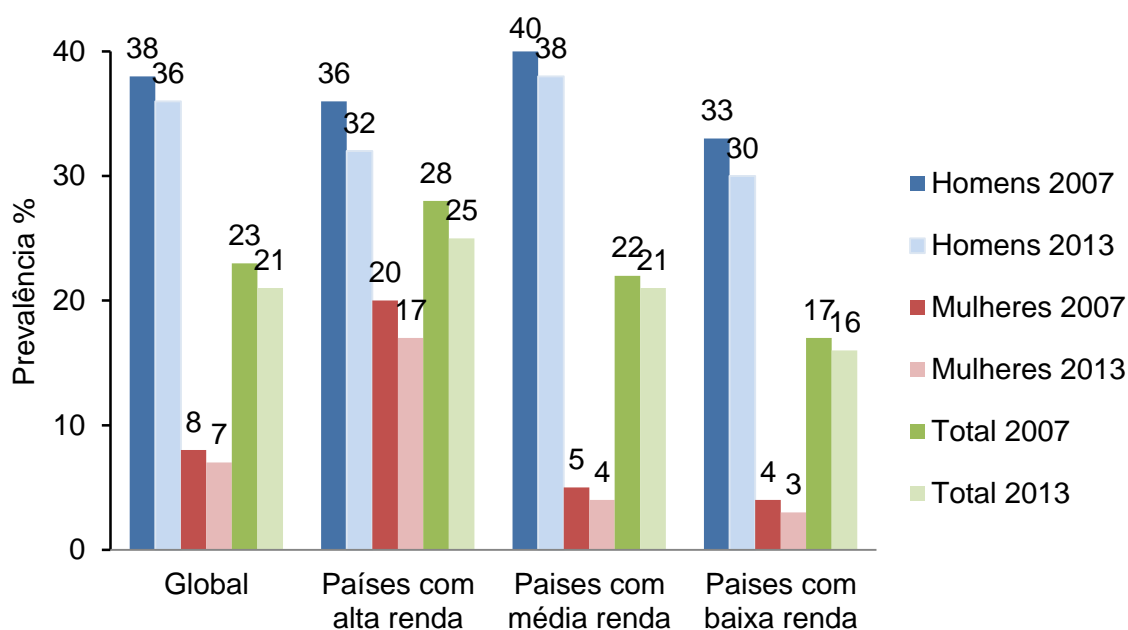


Figura 2. Prevalência global de fumantes entre os anos de 2007 a 2013 de acordo com a distribuição de renda (Adaptado de OMS, 2014).

Mais de 90% dos usuários começam a fumar antes dos 19 anos de idade, sendo a idade média de 15 anos para início de uso (INCA, 2011). Segundo o Banco Mundial o tabagismo agrava a fome e a pobreza, pois pela dependência, muitos pais deixam de alimentar seus filhos para comprar cigarro ou seus derivados, agravado pelo fato de que em alguns países é mais barato comprar cigarros do que alimentos (World Bank, 2003). O Brasil é hoje o maior exportador de tabaco do mundo, desde 1993 (Portal do Tabaco, 2017). Embora isso, cerca de 35% dos cigarros comercializados no país são contrabandeados e comercializados por menor preço do que o do mercado legal, favorecendo sua aquisição e consumo entre jovens e adultos economicamente desfavorecidos (Cavalcante, 2003).

3.2. Implicações do uso de álcool, cigarro e sua associação

O consumo de bebidas alcoólicas faz parte de processos culturais de diversos países (McGovern, 2009). Como mencionado, o uso de álcool está entre os 5 principais fatores de risco para doenças, incapacitação e morte no mundo. As doenças mais frequentes estão apresentadas na Figura 3 (OMS, 2014).

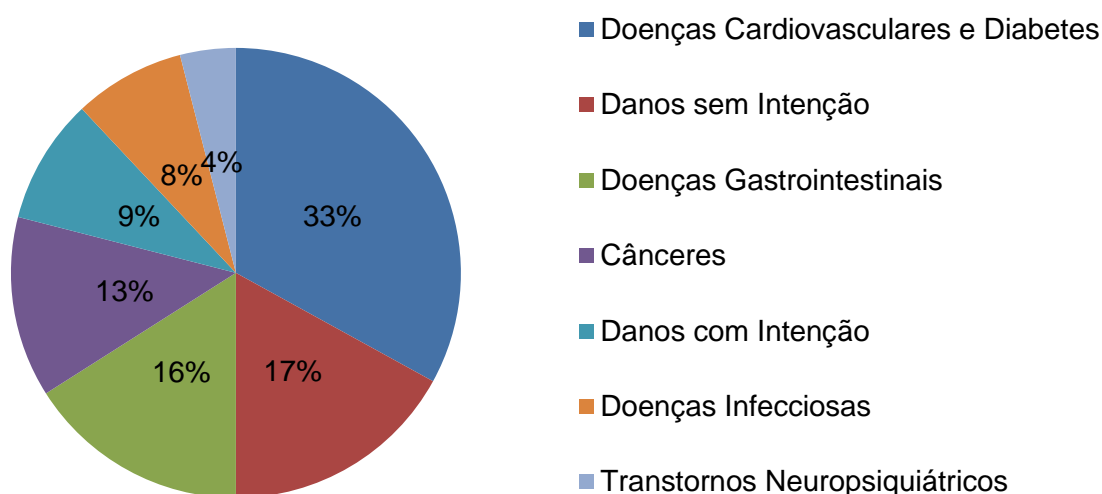


Figura 3. Distribuição de doenças com morte associadas ao uso de álcool (Adaptado de OMS, 2014)

Álcool é depressor do sistema nervoso central, apresentando efeito ansiolítico e sedativo, promovendo descoordenação motora, desinibição, relaxamento, euforia, agitação (de acordo com a dose), déficit cognitivo e de memória e quando usado de forma crônica, causa dependência (McKeon et al., 2008). Conceitualmente, alcoolismo ou doença associada ao uso de álcool (*alcohol use disorder* - AUD), é caracterizada como doença crônica recorrente, definida por 5 características principais como: frequentes episódios de intoxicação, uso de álcool apesar de consequências adversas, compulsão pelo uso, perda do controle sobre o uso e aparecimento de sintomas emocionais negativos na abstinência (American Psychiatric Association, 1994).

Cigarro, por outro lado, é a forma industrializada mais comum para consumo inalatório da fumaça produzida pela queima das folhas secas de tabaco (*Nicotina rusticum* e *Nicotina tabacum*) (SISP, 2017). Dentre os componentes voláteis da

fumaça estão monóxido e dióxido de carbono. Nicotina e alcatrão compõem a porção particulada da fumaça. Além da nicotina presente nas folhas de tabaco, cerca de 4.700 compostos são produzidos pela queima do cigarro (SISP, 2017).

Entre as principais doenças causadas pelo uso do cigarro, destacam-se câncer de pulmão (71% dos casos), bronquite crônica, enfisema pulmonar, coronariopatias, cânceres de língua, faringe, esôfago e bexiga (OMS, 2010). Também está comprovado que o fumo durante a gravidez aumenta a incidência de queda ponderal de peso do feto, prematuridade, aborto e mortalidade neonatal (Tarantino, 1982). Cabe ainda ressaltar que a nicotina, principal componente psicoativo do cigarro, aumenta o estado de alerta, cognição e memória além de reduzir a irritabilidade e a agressividade (Crooks e Dwoskin, 1997).

Estudos mostram que indivíduos dependentes de álcool fumam regularmente, e estes que fumam consomem maior quantidade de álcool do que indivíduos não fumantes (Pomerleau et al., 1997; Room, 2004). Além de consumirem maiores quantidades de álcool por ocasião, fumantes tendem a ingeri-lo com maior frequência que não fumantes. Outros estudos mostram que alcoolistas fumantes têm mais dificuldade de se tornarem abstinente ao cigarro (Romberger e Grant, 2004). Porém há poucos estudos avaliando o efeito dessas duas substâncias em associação sobre a saúde humana, uma vez que o efeito deletério à saúde de cada uma delas, isoladamente, já é bastante conhecido, quando utilizada cronicamente e em grandes concentrações (OMS, 2012). Os efeitos da associação entre álcool e cigarro sobre o SNC são um pouco mais conhecidos, pois estudos mostram que uma substância afeta o desempenho da outra, em testes de memória, em seres humanos e animais (Friedman et al., 2011; Gulick e Gould, 2008; Sanday et al., 2013). Curiosamente, embora haja uma alta frequência de uso combinado, há poucos estudos avaliando os reais efeitos da interação entre álcool e cigarro. Ainda mais escassos são os grupos de pesquisa que utilizam modelos animais avaliando a associação entre álcool e fumaça de cigarro, uma vez que não apenas a nicotina, mas os outros constituintes do cigarro, quando inalados, podem interferir sobre os efeitos do álcool e a saúde dos usuários.

3.3. Neurobiologia do alcoolismo e do tabagismo

O abuso de drogas é um processo complexo de neuroadaptação (modulado por fatores genéticos e ambientais) no qual são alterados aspectos celulares e moleculares da função neural gerando os efeitos comportamentais destas substâncias (White, 2002). Sabe-se, entretanto, que substâncias de abuso desregulam os principais sistemas cerebrais envolvidos na motivação, recompensa, tomada de decisão e memória (Turton e Lingford-Hughes, 2016).

Álcool é um termo genérico para designar uma família de substâncias químicas orgânicas de propriedade comuns. Etanol ou álcool etílico, cuja fórmula química é $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, está presente em bebidas alcoólicas (Oga et al., 2003). Ele afeta sistemas múltiplos do neurotransmissor no cérebro através da interação direta com proteínas de membrana, como receptores e canais iônicos (Gordis, 1998). No início do uso, o comportamento de beber é motivado pela (busca de um estímulo prazeroso (reforço positivo), enquanto no estado de dependência este comportamento torna-se guiado também pela fuga de um estímulo aversivo (reforço negativo) (Gilpin e Koob, 2008)). Seu consumo produz uma ampla gama de efeitos nos sistemas excitatórios e inibitórios do cérebro, que em combinação são responsáveis pelos seus efeitos característicos (Pierce e Kumaresan, 2006). Entre eles, podemos exemplificar as deficiências de memória relacionadas geradas por sua atividade antagônica em receptores de glutamato de N-metil-D-aspartato (NMDA), reduzindo a neurotransmissão glutamatérgica excitatória (Turton e Lingford-Hughes, 2016). De fato, Vasconcelos e colaboradores (2008) demonstraram que a administração do álcool aumenta os níveis de glutamato no corpo estriado de rato e que esse efeito foi revertido pela associação do álcool com ketamina, um antagonista não-competitivo do receptor NMDA.

A nicotina é considerada uma droga psicoativa estimulante e seu mecanismo de dependência é semelhante ao da cocaína, heroína ou outras drogas de abuso (Meirelles, 2009). Na queima do cigarro, o fumante inala (tragar) profundamente, fazendo a nicotina alcançar os bronquíolos terminais e os alvéolos, onde o pH da levemente ácido da fumaça (cerca de 6,0) finalmente se alcaliniza para ser melhor absorvida (Meirelles, 2009). Dos alvéolos, a nicotina atinge o cérebro em aproximadamente 7 segundos, onde se propaga para regiões corticais, tálamo,

hipotálamo, hipocampo, núcleo acumbens e tronco cerebral, agindo principalmente no sistema mesolímbico-dopamínico (Meirelles, 2009). Devido a sua estrutura molecular semelhante à da acetilcolina (Figura 4), a nicotina interage com receptores nicotínicos presentes nas membranas de muitos neurônios, também denominados receptores nicotínicos-acetilcolínicos (nAChRs), distribuídos nas regiões periféricas e centrais do cérebro (Rosemberg, 2004; Kirchenchtein e Chatkin, 2004; Fagerström, 2006). Ao serem ativados, os receptores nicotínicos podem modular outros sistemas neurotransmissores e neuroreguladores, resultando em alguns efeitos da nicotina como prazer, alerta, diminuição do apetite, melhora da memória, redução da ansiedade, entre outros (Meirelles, 2009).



Figura4. Comparação da estrutura química da acetilcolina e da nicotina.

Não há estudos avaliando a interferência da associação entre álcool e cigarro sobre esses sistemas neurotransmissores, tampouco se seu uso combinado pode aumentar o reforço positivo dessas drogas, acelerando processos de adição ou agravando síndrome de abstinência.

3.4. Efeito do alcoolismo e tabagismo, sobre a memória

Memória é definida como aquisição, formação, conservação e evocação de informações (Izquierdo et al., 2002). Memórias de curta duração são fenômenos de natureza bioquímica, que envolvem plasticidade sináptica e que se relacionam com a consolidação de memórias de longo prazo (Izquierdo et al., 2002). Já a memória de longa duração é consolidada por células especializadas do hipocampo e das áreas do córtex com as quais ele se conecta (Izquierdo et al., 2002). Diferente da memória de curta duração, que perdura de 1 a 3 horas após o aprendizado, a

memória de longa duração perdura por dias, meses ou anos, sendo também chamada de memória remota (Izquierdo et al., 2002; Moncada e Viola, 2007).

Segundo Wester et al. 2004, o uso prolongado de álcool pode resultar em distúrbios cognitivos que incluem déficits de memória, comprometimento visuoespacial, déficits de atenção e disfunção executiva, mas a extensão em que esses domínios são afetados varia bastante. Entretanto, de forma controversa, doses baixas de álcool não comprometem a memória (Berry e Matthews, 2004) ou até mesmo a melhoram (Gulick e Gould, 2008).

A nicotina, por sua vez, é capaz de melhorar o desempenho de ratos em testes de memória de longa duração (Haroutunian et al., 1985; Puma et al., 1999). Um único estudo, avaliando o efeito da fumaça do cigarro sobre a memória em camundongos adolescentes, mostra que a memória de longa duração está comprometida pela exposição por 15 dias à fumaça do cigarro (Abreu-Villaça et al., 2013).

Quando avaliados em associação álcool e cigarro ocasionam um aumento da apoptose hipocampal, associada à déficit de memória e aprendizado (Abreu-Villaça et al., 2013; Gomez et al., 2015; Jang et al., 2012; Oliveira-da-Silva et al., 2009). Entretanto alguns estudos mostram que a nicotina não reverte o déficit de atenção produzido pela administração de álcool (Bizarro et al., 2003), enquanto outros mostram que ela aumenta cognição e memória e que a administração de álcool reduz esses parâmetros (Rezvani e Levin, 2002).

3.5. Influência do alcoolismo e tabagismo nos níveis de BDNF

O BDNF é uma pequena proteína dimérica, membro da família de fatores neurotróficos de crescimento (Leibrock et al., 1989). Está envolvido no crescimento, desenvolvimento, regeneração, sobrevivência, manutenção e função dos neurônios (Park e Poo, 2013). Também é relacionado com plasticidade sináptica e, por consequência, está envolvido em mecanismos de aprendizagem, participando de respostas de potencialização de longo prazo (LTP) e consolidação da memória (Lang et al., 2007; Thoenen, 1995). Estudos mostram que há uma correlação entre mecanismos de neurogênese no giro dentado no hipocampo e memória (Zhao et al.,

2008), e que novas células granulares são seletivamente recrutadas para as redes hipocampais com aprendizagem (Kee et al., 2007). Além disso, se supõe que a apoptose coordenada e os mecanismos de neurogênese sejam especialmente importantes para a formação da memória, pelo menos para algumas formas de aprendizagem dependente do hipocampo com participação do BDNF (Dupret et al., 2007).

Estudos mostram que o BDNF é parte de uma via homeostática que controla alguns dos efeitos adversos associados à exposição ao álcool (Ron and Messing, 2013). Em modelos animais, depleção de BDNF está associado a comportamentos de ansiedade, resultando em aumento do consumo de álcool, o que pode ser prevenido pela confusão de BDNF (Sakai et al., 2005). Além disso, a infusão de BDNF na amígdala medial diminui o consumo de álcool, enquanto a inibição da produção de BDNF no núcleo mediano ou central da amígdala aumenta a preferência por álcool em um modelo de livre escolha (Pandey e Agrawal, 2006). A redução de BDNF em modelos de autoadministração crônica de álcool é demonstrada no hipocampo (MacLennan et al., 1995), córtex frontal e pré-frontal, sem alterações no estriado em roedores (Ebada et al., 2014, Fernandez et al., 2016, Logrip et al. Al., 2009).

O número de cigarros fumados por dia também parece correlacionar-se com os níveis séricos de BDNF (Zhang et al., 2010), mais precisamente uma associação positiva, o que sugere que o tabagismo está associado ao aumento dos níveis séricos de BDNF (Bus et al., 2011). Além disso, Lang e colaboradores (2007) demonstraram que o comportamento de fumar é mais frequente em seres humanos portadores do alelo Met na posição de aminoácidos 66 da variação missense do BDNF (val66met) e ainda aumenta a possibilidade de que portadores de Met tentem compensar um comprometimento cognitivo pela ingestão de nicotina. A exposição repetida a fumaça de cigarro também reduz os níveis de BDNF no córtex pré-frontal de ratos expostos durante o período de desenvolvimento pré-natal e pós-natal (Xiao et al., 2015) ou no hipocampo de ratinhos infantis e adultos (Lobo Torres et al., 2012, Tuon et al., 2010, Xiao et al., 2015).

3.6. Uso de álcool, cigarro e a geração de espécies reativas

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são produtos de processos metabólicos em muitos órgãos e tecidos (Comporti et al., 2010; Drougard et al., 2015). Este processo é essencial para a manutenção e regeneração celular em todos os tecidos, incluindo o SNC (Cobb e Cole, 2015). Quando há o desequilíbrio entre a produção dessas espécies reativas e os antioxidantes endógenos, ocorre o processo conhecido como estresse oxidativo, que pode ser deletério para os tecidos (Cobb e Cole, 2015). A concentração de antioxidantes no encéfalo é menor se comparada a tecidos periféricos, no entanto, não se considera que o encéfalo seja mais susceptível a danos gerados por estresse oxidativo (Cobb e Cole, 2015). As células nervosas utilizam recursos antioxidantes como a glutathione (GSH), para preservar o equilíbrio redox (Aoyama e Nakaki, 2015).

O estresse oxidativo induzido pelo álcool está relacionado principalmente ao seu metabolismo, realizado por três vias metabólicas distintas envolvendo as enzimas: álcool desidrogenase, sistema de oxidação microsomal de etanol (MEOS) e catalase (Das e Vasudevan, 2007). Cada uma dessas vias é capaz de produzir espécies reativas, entretanto a via catalisada pela enzima álcool desidrogenase forma, além desses radicais, o acetaldeído, um metabólito ainda mais tóxico que o próprio álcool. Uma das principais enzimas responsáveis pela neutralização dos efeitos tóxicos do acetaldeído é a GSH, que encontra-se diminuída especialmente no cerebelo, estriado e córtex após intoxicação por álcool (Augustyniak et al., 2005).

Estima-se que cada tragada de fumaça de cigarro carregue cerca de 1015 espécies reativas que danificam micro e macromoléculas em diferentes tecidos, com maior vulnerabilidade para pulmões e cérebro (G et al, 2017). Além dos radicais de oxigênio e de carbono, passam pelo sistema de filtro do cigarro substâncias altamente reativas que aumentam a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (Church e Pryor, 1985). O acúmulo destas espécies reativas nos tecidos pode ser devido a um aumento na geração de oxidantes, a uma diminuição dos agentes de defesa antioxidantes ou à incapacidade de reparar danos oxidativo (Naik et al., 2014; Uttara et al., 2009). Além disso, o efeito do estresse oxidativo

induzido pelo fumo de cigarro pode ser exacerbado com o envelhecimento e a doença de Alzheimer (Cano et al., 2010).

3.7. Alcoolismo, tabagismo e neuroinflamação

Citocinas são proteínas multifuncionais que desempenham um papel crítica na comunicação e ativação celular sendo representadas por interferons, interleucinas, fatores de crescimento, TNF α , quimiocinas e outras (Crews et al., 2006). A maioria das células do sistema imunológico respondem às citocinas, aumentando a síntese das mesmas e promovendo uma cascata pró-inflamatória (Crews et al., 2006). O TNF- α e a IL-1 β são liberados pela ativação metabólica da micróglia e astrócitos, promovendo aumento do consumo de oxigênio e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), gerados pela neuroinflamação (Maes, 2013).

O alcoolismo tem sido reconhecido como uma doença inflamatória sistêmica, sendo responsável pelo aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias em humanos e roedores (Crews e Vetreno, 2014; González-Quintela et al., 2000; González-Reimers et al., 2014). A administração crônica de álcool aumenta os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, entre outras e da proteína quimioatraente de monócitos no soro, fígado, córtex e hipocampo de camundongos (Qin et al., 2008). O uso excessivo de álcool também aumenta a concentração sérica da proteína C reativa, um marcador de inflamação sistêmica em alcoolistas (Alho et al., 2004; Liukkonen et al., 2006). Além disso, vários sinais pró-inflamatórios estão associados ao aumento da preferência e consumo de álcool em modelos animais de autoadministração (Blednov et al., 2012). Dados mostram que a inflamação periférica promove aumento no consumo voluntário de álcool, enquanto a administração de anti-inflamatórios reduz seu consumo em animais (Agrawal et al., 2011; Blednov et al., 2012).

A fumaça do cigarro, por outro lado, também estimula a resposta inflamatórias (Figura 5), aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- α e interleucina (IL-1, IL-6 e IL-8), diminuindo a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Arnson et al., 2010; Gonçalves et al., 2011). Petrescu e colaboradores (2010) verificaram que os níveis séricos de TNF- α eram significativamente mais elevados nos fumantes em comparação com não fumantes.

Esses níveis eram ainda maiores entre indivíduos que fumaram mais de uma carteira por dia (20 cigarros), evidenciando uma correlação positiva entre os níveis séricos de TNF- α e número de cigarros consumidos (Petrescu et al., 2010). Níveis mais elevados de IL-1 β e TNF- α também foram encontrados no soro de fumantes ativos em comparação com não-fumantes (Barbieri et al., 2011). Ambas as citocinas IL-1 β e TNF- α desempenham papéis importantes na patogênese de perturbações inflamatórias (Barbieri et al., 2011).

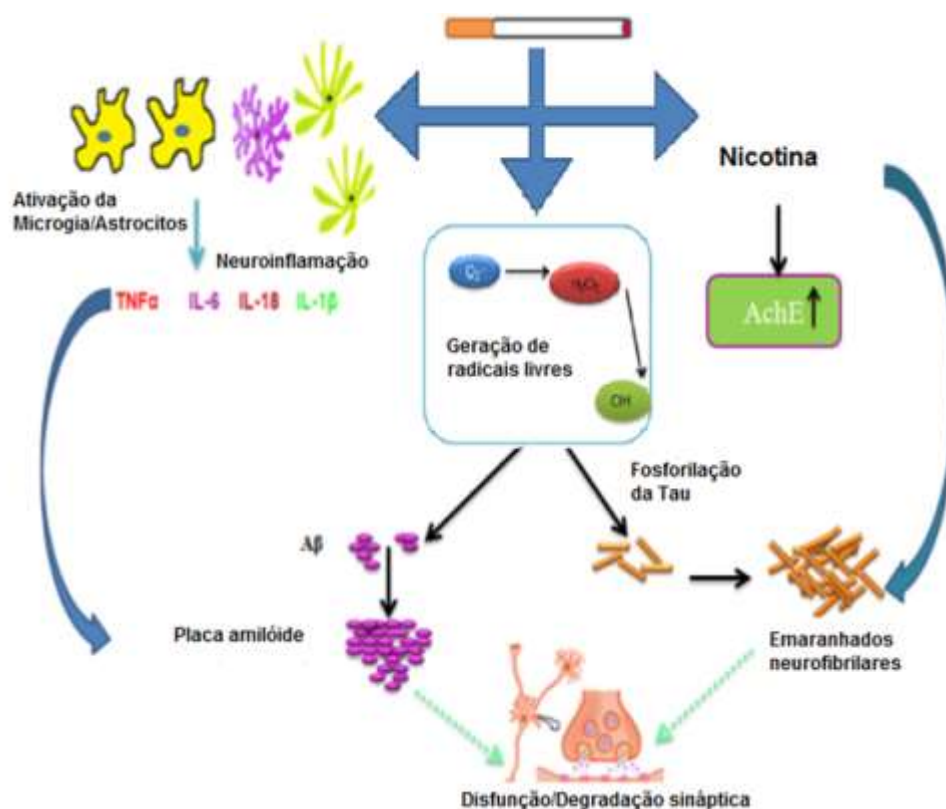


Figura 5. Espécies reativas da fumaça do cigarro provocam estresse oxidativo e inflamação que levam à disfunção sináptica e neurodegeneração do cérebro (Adaptado de G, 2017).

3.8. Glutamato e uso de álcool e cigarro

O glutamato, reconhecido como o principal neurotransmissor excitatório do SNC é crucial para plasticidade neuronal e, conseqüentemente, para processos de aprendizado e memória (Peng et al., 2011). No cérebro, a enzima glutamina sintetase é utilizada como um importante agente na redução da concentração de

amônia, com conseqüente desintoxicação e síntese de glutamina para nova síntese de glutamato (Rowbottom et al., 1996) como representado na Figura 6.

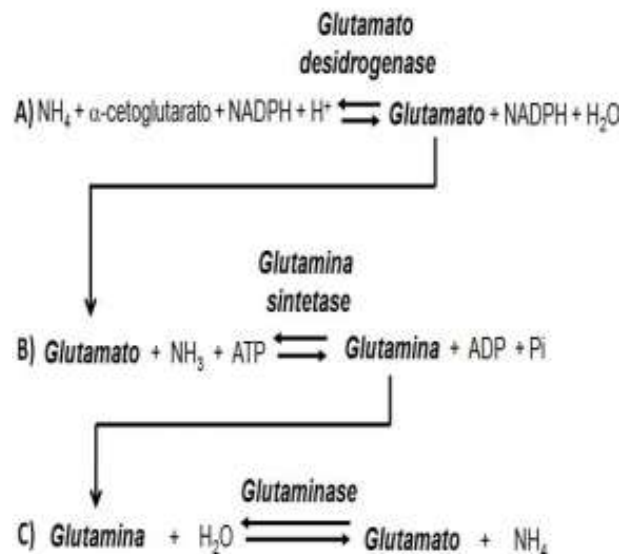


Figura 6. Síntese de glutamato pela ação da enzima glutamato desidrogenase (A), síntese de glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase (B) e hidrólise de glutamina a glutamato pela enzima glutaminase (C).

A desregulação glutamatérgica tem sido considerada um fator chave no alcoolismo (De Witte et al., 2003; Tsai e Coyle, 1998). Microdiálise cerebral em ratos mostrou um aumento dos níveis de glutamato extracelular durante a retirada do álcool (Dahchour et al., 1998). Por outro lado, a inibição da recaptção de glutamato usando ácido dl-treo-p-benziloxaspártico (TBOA) mostrou um aumento no consumo voluntário de álcool (Kapasova e Szumlinski, 2008). Esses resultados evidenciam que a exposição ao álcool reduz a atividade de GS (Davies e Vernadakis, 1984) e inibe a proliferação em cultura de astrócitos, onde GS se expressa de modo exclusivo, sendo um dos marcadores de sua função (Kane et al., 1996). Nicotina administrada em células piramidais do córtex pré-frontal medial aumenta a concentração de glutamato extracelular em camundongos (Lambe et al., 2003). Estudos demonstraram também, que o bloqueio dos receptores de glutamato reduz a autoadministração de nicotina (Kenny et al., 2003; Sidique et al., 2012).

ARTIGO

Os resultados da investigação realizada nessa dissertação permitiram a redação de um artigo intitulado: “***Combined use of alcohol and cigarette smoke on neurotrophic, inflammatory, and oxidative parameters in different brain areas of rats***”, tendo como autores Dayane A. Quinteros, Bruna Bellaver, Solange Bandiera, Larissa Bobermin, Alana. W. Hansen, Rianne R. Pulcinelli; Greice Caletti, Andre Quincozes-Santos e Rosane Gomez.

O mesmo será publicado preferencialmente no periódico Drug and Alcohol Dependence - Fator de impacto do periódico: 3.349

Combined use of alcohol and cigarette smoke on neurotrophic, inflammatory, and oxidative parameters in different brain areas of rats

Dayane A. Quinteros^a, Bruna Bellaver^b, Solange Bandiera^a, Larissa Bobermin^b, Alana. W. Hansen^a, Rianne R. Pulcinelli^a; Greice Caletti^a, Andre Quincozes-Santos^b, Rosane Gomez^{a,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Farmacologia e Terapêutica (PPGFT), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Rosane Gomez

Departamento de Farmacologia - ICBS -UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500/305

ZIP Code 90050-170 – Porto Alegre – RS - Brazil

Phone/fax: 55-51-33083121

E-mail: rosane.gomez@ufrgs.br

Chemical compounds studied in this article: Ethanol CID: 702

Abstract

Although the devastating effect of alcohol use disorders and cigarette smoke habit on health, few studies explore the consequences of their combined use. Here we studied the effect of the combined use of alcohol and cigarette smoke on neurotrophic, inflammatory, and oxidative parameters in the hippocampus, striatum, and frontal cortex of rats, as well its effect on the short-term memory. Adult male Wistar rats were treated with 2 g/kg alcohol, via oral, and exposed to smoke from 6 cigarettes, twice a day, for 28 days. Results were compared with alcohol-air, smoke-saline, or saline-air treated rats. On day 26, they were exposed to the inhibitory avoidance test for short-term memory effect. On day 28, they were euthanized and brain areas were dissected for Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), pro-inflammatory cytokines: interleukin 1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), glutamine synthetase (GS), glutathione (GSH), and intracellular free radical 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) analyzes. Our results showed that the combined use significantly decreases BDNF levels and increased IL-1 β in all brain areas, as well as increased TNF- α in the striatum and hippocampus, and increases reactive species in the hippocampus of rats. Combined use did not affect short-term memory in rats. Our results evidenced that combined use is even more deleterious than alcohol or cigarette isolated use, and the damage is dependent of the brain area studied.

Keywords: Cytokines, BDNF, Ethanol, Reactive species, Cigarette Smoke, Glutamine synthetase

1. Introduction

According to World Health Organization, harmful use of alcohol causes a large disease, social, and economic burden in society and tobacco consumption is epidemic and one of the biggest public health problem (WHO, 2016, 2014). Alcohol use disorder causes more than 60 diseases and is associated with violence and road traffic accidents associate to more than 3 million death per year (WHO, 2014). Active or passive cigarette smoking, on the other hand, is associated with more than 6 million deaths per year, related to pulmonary, cardiac, vascular diseases, or different forms of cancer (WHO, 2016). Although these alarming numbers related to alcohol use and cigarette smoke, few studies explore the biological and functional consequences of their combined use. Almost 80% of alcoholics smoke regularly and smokers consume more alcohol per occasion than non-smokers (Bobo and Husten, 2000; Pomerleau et al., 1997; York and Hirsch, 1995). Moreover, smokers consume alcohol in a higher quantity per occasion and more frequently than nonsmokers (York and Hirsch, 1995).

Chronic alcohol use has been recognized as a systemic inflammatory disease (Crews and Vetreno, 2014; González-Reimers et al., 2014; Qin et al., 2008). Indeed, alcohol use increases plasma levels of pro-inflammatory cytokines in humans and rodents (Crews and Vetreno, 2014; González-Quintela et al., 2000; González-Reimers et al., 2014). In the brain, cytokines as TNF- α and IL-1 β enhance in microglia and astrocytes after alcohol administration or trauma, activating intracellular cascades relate to apoptotic pathways (Dinarello, 2007). Chronic alcohol use also decreases plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels, a neurotrophin that play a key role in the synaptic plasticity, neurogenesis and neuronal survival (Binder and Scharfman, 2004; Fernandez et al., 2016; Joe et al., 2007). Additionally, *in vitro* and *in vivo* studies show that alcohol and its metabolite acetaldehyde generate reactive oxygen species and decrease antioxidant enzymes levels, leading to oxidative damage on membrane lipid and proteins, and DNA (Bondy and Guo,

1995; Hernández et al., 2016). Both oxidative stress and neuroinflammatory effects may promote structural and functional changes in brain areas, related to neurodegenerative process, impairing behavioral control, mood, learning, and memory, related to alcohol use disorder (Geil et al., 2014; Gomez et al., 2015; Mechtcheriakov et al., 2007).

Cigarette smoke, on the other hand, is a highly complex aerosol composed by more than 4,700 chemical substances distributed between the gas and particulate phases (Church and Pryor, 1985). Some of these substances are known to directly activate cell intracellular signaling cascades, increasing pro-inflammatory mediators as TNF α and IL-1 β in rodents (Khanna et al., 2013; Lee et al., 2012). Moreover, cigarette smoke contain simple oxygen and carbon radicals and other reactive substances, such as polyunsaturated aldehydes and ketones, known to increase the production of oxygen and nitrogen reactive species, promoting oxidative stress in different tissues (Anbarasi et al., 2006; Church and Pryor, 1985; Khanna et al., 2013; Ramesh et al., 2015). In previous studies the combined use of alcohol and cigarette smoke or nicotine decreased up to 60% cell proliferation in the hippocampus of rats (Gomez et al., 2015; Jang et al., 2002; Oliveira-da-Silva et al., 2009). Reduced hippocampal neurogenesis may influence regional functions, decreasing learning and memory. Indeed, both chronic alcohol intake or cigarette smoking are associated to cognitive decline, affecting memory in humans (Anstey et al., 2007; Bernardin et al., 2014; Durazzo et al., 2012; Kim et al., 2012). However, there is no study evaluating the combined use of alcohol and cigarette smoke on neurotrophic, inflammatory, and oxidative parameters in different brain areas of rats, as well its effect on short-term memory.

We hypothesize that the combined use of alcohol and cigarette is even more deleterious than their isolated use, increasing the risk of neural damage in alcoholics who smoke. For clarify these, we aimed here to study the effect of the combined use on neurotrophic, inflammatory, and oxidative parameters in the hippocampus, striatum, and

frontal cortex, as well its effect on the short-term memory of rats.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Adult, male Wistar rats (~ 280 g) born and reared at the Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals (CREAL- UFRGS) were housed in the animal facility of the Department of Pharmacology, in polypropylene cages (3 rats/cage, 33 × 40 × 17.8 cm). Environmental conditions were controlled (22 ± 2 °C; 12 h light/dark cycle; $55 \pm 5\%$ air humidity) and rats had free access to water and food (Nuvilab, Colombo, Brazil). All procedures were performed according to international and local policies for experimental animal handling and the Ethics Committee for Animal Experimentation approved this study (CEUA-UFRGS # 30088).

2.2. Alcohol solution and cigarette smoke

Ethanol (98%) (Nuclear, São Paulo, Brazil) was diluted to 20% (w/v) in tap water, daily prepared, and administered at the volume of 10 mL/kg by oral gavage. Control rats received the same volume of tap water. Cigarettes from a commercial brand (0.8 mg of nicotine/cigarette, according to the manufacturer) were burned in an appropriated apparatus and smoke was dragged to a hermetically sealed glass chambers (50 × 30 × 30 cm), by a negative airflow of 10 L/min, maintained constant by a vacuum pump (Gomez et al., 2015)

2.3. Experimental procedure

Animals were allocate in control (CT) or cigarette smoke (CS) groups to receive tap water, and in alcohol (AL) or alcohol + cigarette smoke (ALCS) groups to receive 2 g/kg alcohol, via oral, twice a day (9 AM and 2 PM), for 28 days (n = 12/group). Immediately after

the oral administration, animals were placed in hermetic chambers (n = 6 rats/chamber), with ambient air (CTR and ALC groups) or cigarette smoke (6 cigarettes; CS and ALCS groups) circulation, for 2 h (Figure 1). Cigarettes were burned with a 10 min interval between one and other to avoid intoxication of rats. The total per day treatment was 4 g/kg alcohol and 12 burning cigarettes. On day 26, the rats were trained in the inhibitory avoidance task (described below) to evaluate the interference of alcohol, cigarette smoke, or their combined use on short-term memory (tested 1.5 h after training). Both, training and tests were performed with no interruption of the experiment. Training started at 12 PM followed by the short-term memory test (1.5 h), before the afternoon exposure. On day 28, rats were euthanized by decapitation 60 min after the morning treatment. Trunk blood samples were centrifuged (2,5 rpm/10 min) and serum stored at -30 °C for analysis of DCFH-DA and GSH. Brain was removed and the frontal cortex, hippocampus, and striatum was carefully dissected and stored at -80 °C for further analysis of BDNF, TNF- α , IL-1 β , DCFH-DA, GSH, and GS.

2.4. BDNF Concentration

Changes on the BDNF levels were assessed using the ChemiKine brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Sandwich ELISA kit (Millipore, USA), following the manufacturer's recommendations. Briefly, the slices of hippocampus, frontal cortex, or striatum were individually homogenized in buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 2% bovine serum albumin (BSA), 1 M NaCl, 4 mM EDTA·Na₂, 2% Triton X-100, 0.1% sodium azide, and a cocktail protease inhibitors (Sigma, Sao Paulo, Brazil). Samples were centrifuged for 30 min at 14,000 ×g and after the supernatant was incubated on a 96-well microplate previously coated with anti-BDNF monoclonal antibody. After blocking, plates were incubated with biotinylated mouse anti-BDNF monoclonal antibody for 2 h and streptavidin-HRP conjugate solution for 1 h. Then color reaction with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

substrate was quantified in a plate reader at 450 nm. The standard BDNF curve ranged from 7.8 to 500 pg/mL. Results are presented as pg/mg of protein.

2.5. TNF- α and IL-1 β measure

TNF- α and IL-1 β assays were carried out, using a rat TNF- α ELISA and IL-1 β ELISA, respectively, from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Results are presented as pg/mg.

2.6. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production

Reactive oxygen species (ROS) are small oxygen-containing molecules, highly reactive, that can react with and damage complex cellular when overproduced. DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluorescein diacetate) oxidation assay was used to measure ROS production, by directly measuring the redox state of a cell (Eruslanov and Kusmartsev, 2010). Slices from frontal cortex, hippocampus, or striatum were treated with 10 mM DCFH-DA for 30 min at 37 °C. After DCFH-DA exposure, the slices were placed into PBS with 0.2% Triton X-100. Fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max M5, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm. The ROS production was calculated as fluorescence units per milligram protein (UF/mg).

2.7. Glutathione (GSH) Content Assay

GSH is the major antioxidant enzyme in the central nervous system (CNS) and lower levels increases vulnerability to oxidative stress and neuroinflammation. GSH levels were assessed as previously described (Browne and Armstrong, 1998). Briefly, frontal cortex, hippocampus, and striatum were homogenated in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. Homogenates were diluted in 10 volumes of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA. The protein was precipitated with 1.7%

meta-phosphoric acid and the supernatant was assayed with o-phthalaldehyde (1 mg/mL methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths at 350 and 420 nm, respectively (Browne and Armstrong, 1998). A calibration curve was built with standard GSH solutions (0 – 500 μ M) and GSH levels were calculated as nmol/mg protein.

2.8. Gutamine Synthetase (GS) measure

GS is an astrocytic enzyme that metabolizes glutamate and ammonia to glutamine, playing a pivotal role in the astrocyte glutamate uptake/release and the glutamate-glutamine cycle (Rose et al., 2013). For GS activity assay, the tissues were homogenized in a 150 mM KCl solution and assayed as previously described (dos Santos et al., 2006). Homogenate was added to a reaction mixture (MgCl₂: 10 mM; L-glutamate: 50 mM; imidazole-HCl buffer (pH 7.4): 100 mM; 2-mercaptoethanol: 10 mL; hydroxylamineHCl: 50 mM; ATP: 10 mM) 1:1, and incubated at 37 °C for 15 min. Reaction was stopped by adding 0.4 mL of a solution with ferric chloride: 370 mM, HCl: 670 mM, and trichloroacetic acid 200 mM. Samples were centrifuged (1,000 g/10 min) and the absorbance of the supernatant was measured at 530 nm. C-glutamylhydroxamate added to ferric chloride reagent was used as a standard. The results are expressed as mmol/h/mg of protein.

2.9. Inhibitory avoidance task

The inhibitory avoidance apparatus is an acrylic box (50 × 25 × 25 cm³) whose floor has parallel stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart (Insight, Sao Paulo, Brazil). A 7-cm wide, 2.5-cm high platform is placed on the floor of the box against one wall. In the training session, rats were individually placed on the platform and the latency to step-down on the grid with four paws was recorded. When their paws touched the grid, they

received a 0.4 mA footshock for 3 s and were immediately removed from the apparatus. They returned at 1.5 h to the apparatus to record the latency to step-down (maximum 180 s). No footshock was presented at this time. Short-term memory is showed as latency to step-down from the platform in the test session and the memory index was calculated as the latency to step-down in the training session divided by the sum of latency to step step-down in the training session, multiplied by 100 to represent it as perceptual of learning. This index consider the stimulatory effect of cigarette smoke in rats.

2.10. Statistical analysis

The results were firstly tested for normal distribution by the Shapiro-Wilk test. Parametric values were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA), with alcohol and cigarette smoke as independent factors, followed by the Bonferroni post-hoc test. Non-parametric values were analyzed using the Kruskal-Wallis followed by the Dunn's test. Statistical significance was considered when $P < 0.05$. All analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 21.0, and results are presented as $\text{men} \pm \text{S.E.M.}$

3. Results

3.1. Combined use of alcohol and cigarette reduces BDNF levels in level in the hippocampus, striatum and frontal cortex of rats

Our results showed that BDNF levels was lower in the hippocampus of AL, CS, or ALCS rats than CT rats ($F_{(1,23)} = 26.83$; $P < 0.001$, Figure 2-A). An additional decreasing on BDNF levels was showed in the ALCS group compared with AL ($P = 0.020$) and CS ($P = 0.006$) rats, supporting our hypothesis of the more deleterious effect of the combined use of alcohol and cigarette. Additionally, in the striatum, BDNF levels decreased only in the ALCS

group ($F_{(1,23)} = 23.26$; $P < 0.001$; Figure 2-B) with an interaction effect in this specific brain area ($F_{(1,23)} = 6.02$; $P = 0.025$)(Figure 2-B) . Results from the frontal cortex followed the same pattern of the hippocampus with all treatments (AL, CS, and ALCS) decreasing BDNF levels ($F_{(1,23)} = 119.54$; $P < 0.001$) compared with CT rats (Figure 2-C). In summary, combined use (ALCS) significantly decreased the BDNF levels in the hippocampus ($\downarrow 65\%$), striatum ($\downarrow 66\%$), and frontal cortex ($\downarrow 82\%$) compared with CT group. AL and CS groups also decreased BDNF levels in the hippocampus and frontal cortex, by 38% and 42%, respectively, from CT rats.

3.2. Combined use of alcohol and cigarette increases TNF- α level in the striatum and frontal cortex, and IL-1 β level in the hippocampus, striatum and frontal cortex of rats

In the hippocampus AL ($P = 0.018$), CS ($P = 0.041$), and ALCS ($P=0.009$) groups significantly increased the TNF- α level when compared to CT ($F_{(1,23)} = 4.98$; $P = 0.010$)(Figure 3-A). However, in the striatum (Figure 3-B) and in the frontal cortex (Figure 6-C), combined use increased significantly TNF- α level when compared with other groups ($F_{(1,23)} = 18.90$, $P = 0.004$ and $F_{(1,23)} = 27.50$, $P < 0.001$, respectively). Additionally to these results we also showed that AL ($P = 0.017$) and CS ($P = 0.001$) treatment increased TNF- α level in the striatum (Figure 3-B) and AL ($P= 0.027$) treatment increased significantly TNF- α in the frontal cortex (Figure 3-C), when compared with CT group.

The IL-1 β cytokine increased in the of AL, CS, and ALCS rats ($F_{(1,23)} = 37.50$; $P < 0.001$; Figure 4-A) from all treatments in the three brain areas studied, except from the CS group in the frontal cortex (hippocampus: $F_{(1,23)} = 37.50$; $P < 0.001$; striatum: $F_{(1,23)} = 27.54$; $P < 0.001$, frontal cortex: $F_{(1,23)} = 14.50$; $P < 0.001$; Figure 4A-C). For the hippocampus (Figure 4-A) and striatum (Figure 4-B), ALCS combined use increased significantly IL-1 β levels compared with AL (hippocampus: $P = 0.002$ and striatum: $P < 0.001$, respectively) and CS

(both areas: $P < 0.001$) groups and in the frontal cortex (Figure 4-C) compared with CS group ($P < 0.001$).

3.4. Combined use of alcohol and cigarette increases reactive species in the rat hippocampus

We showed that the combined use of alcohol and cigarette (ALCS) significantly increased the intracellular ROS production in the hippocampus of rats compared with CT ($P = 0.002$), AL ($P = 0.011$), and CS ($P < 0.001$) groups ($F_{(1,23)}=36.54$; $P < 0.0001$; Figure 5-A). Combined use was required for this effect as seen by the mathematic interaction between alcohol use and cigarette smoke exposure ($F_{(1,23)}=14.06$; $P = 0.001$). Interestingly, CS showed lower ROS levels than AL ($P = 0.004$) or CT ($P 0.023$) rats, suggesting a neuroprotective of smoke for this specific brain area.

Different results were see in the striatum or frontal cortex. In the striatum, both AL ($P < 0.001$) and CS ($P = 0.001$) rats decreased ROS production and the ALCS combined use prevented this neuroprotective effect (Figure 5-B). The ANOVA-2 way analysis showed a significant interaction between alcohol and cigarette, evidencing that when these drugs are combined we lost the neuroprotective effect of isolate use ($F_{(1,23)} = 24.70$; $P < 0.0001$). The frontal cortex, on the other hand, was not affected by different treatments (Figure 5-C).

With the purpose of to correlate changes on peripheral end CNS, we analyzed the DCFH-DA levels also in blood samples (Figure 5-D). Our results showed that daily moderate doses of alcohol significantly decreased serum ROS levels in AL ($P = 0.012$) and ALCS ($P = 0.023$) compared with CT rats. This effect was lost in CS group.

3.5. Alcohol, cigarette, and their combined use decreases GSH levels according to rat brain area

Our results showed that GSH levels were lower in the hippocampus for AL ($P < 0.001$), CS ($P < 0.001$), and ALCS ($P = 0.002$) compared with CT rats ($F_{(1,23)} = 17.56$; $P < 0.001$; Figure 6-A), independently of alcohol or smoke cigarette exposure. Combined use increased GSH levels compared to ALC rats but did not reach GSH levels as CT rats (ALCS \times AL: $P = 0.016$).

In the striatum, while AL use decreased ($P = 0.045$), CS exposure increased ($P = 0.019$) GSH levels compared to CT rats ($F_{(1,23)} = 15.76$; $P < 0.001$; Figure 6-B), suggesting a neuroprotective effect of smoke cigarette in this specific brain area. We did not find differences in the ALCT and CT rats. As seen for DCFH-DA results, we did not find differences in GSH levels in the rat's frontal cortex (Figure 6-C). Because equal variance test failed we performed a non-parametric analysis for the serum results (Figure 6-D). We showed that GSH was lower in AL group compared with CT or CS groups ($H = 19.37$; $P < 0.001$).

3.6. Alcohol, cigarette, and their combined use decreases GS activity according to rat brain area

GS activity was lower in the hippocampus for AL ($F_{(1,23)} = 11.36$; $P = 0.003$), CS ($F_{(1,23)} = 12.68$; $P = 0.002$), and ALSC ($F_{(1,23)} = 13.81$; $P = 0.001$) compared with CT rats (Figure 7-A). In the striatum, only cigarette smoke exposure decreased GS activity in rats ($F_{(1,23)} = 9.82$; $P = 0.005$; Figure 7-B). Combined use (ALCS) increased GS activity when compared to AL ($P = 0.009$) or CS ($P < 0.001$) rats. In the frontal cortex, GS activity was lower in AL and CS ($P < 0.001$). However combined use increased GS activity in ALCS rats compared to AL ($P = 0.003$) and CS ($P = 0.001$) rats ($F_{(1,23)} = 34.31$; $P < 0.001$) (Figure 7-C).

3.7. Combined use of alcohol and cigarette does not affect short-term memory tested in the inhibitory avoidance task in rats

Under our experimental conditions, we did not find differences in the latency to step-down at the inhibitory avoidance task among CT, ALC, CS, or ALCS group at 1.5 h after training session (Figure 8A and B). Because the training session was performed 2 h from the alcohol administration and 1 hour from the last cigarette smoke, we did not discard that the sedative or psychostimulant effect of these drugs could interfere in the latency to step-down in the training session. In spite of the mathematical strategy used to calculate the memory index, we did not find changes on short-term memory after 28 days of alcohol and/or cigarette smoke exposure in our rat.

4. Discussion

Alcohol and tobacco use are among the top causes of preventable deaths. Although this alarming information, few studies have been explored the combined effects of drinking and smoking on human health. Here we showed that the combined use of alcohol and cigarette smoke is even more deleterious than when they are used alone, in spite of moderate doses have been administered to our rats (4 g/kg/day alcohol + 12 cigarettes/day, for 4 weeks). Combined use of alcohol and cigarette smoke significantly decreased BDNF and increased IL-1 β levels in all brain areas studied, as well as it increased TNF- α in the striatum and frontal cortex of rats. Combined use also promoted reactive species in the rat hippocampus. Additionally, we showed that alcohol or cigarette use alone changes parameters according to the brain area.

BDNF has been studied for its effects on the development, neurogenesis, and synaptic transmission (Binder and Scharfman, 2004). Reduced BDNF levels have been related with neurodegenerative and neuropsychiatry diseases, affecting learning, memory, and mood (Binder and Scharfman, 2004). Here we showed that BDNF levels significantly decreased in the hippocampus, striatum, and frontal cortex of rats after combined use of alcohol and

cigarette, evidencing the more deleterious effect of this combination in the CNS. BDNF levels also decreased in the hippocampus and frontal cortex, but not in the striatum, of rats treated only with alcohol or only with cigarette smoke. Chronic alcohol self-administration decreases BDNF levels in the hippocampus (MacLennan et al., 1995), frontal and prefrontal cortex, with no changes in the striatum in rodents (Ebada et al., 2014; Fernandez et al., 2016; Logrip et al., 2009). Studies suggest that corticostriatal BDNF pathway may regulates responses to alcohol intake, since moderate alcohol consumption increases BDNF levels in the dorsolateral striatum and decreases alcohol intake in animals (Jeanblanc et al., 2009; Logrip et al., 2015). Authors suggest this BDNF pathway plays a crucial role in the regulation of alcohol intake and when it becomes dysregulated drives the transition from moderate to high alcohol intake (Jeanblanc et al., 2009; Logrip et al., 2015). Repeated cigarette smoke exposure also reduces the BDNF levels in the prefrontal cortex of mice exposed during prenatal and early postnatal period of development (Xiao et al., 2015) or in the hippocampus of infant and adult mice (Lobo Torres et al., 2012; Tuon et al., 2010; Xiao et al., 2015). Additionally, in humans, plasma BDNF levels are significantly lower in smokers than nonsmokers (Bhang et al., 2010). As aforementioned, combined use was even more deleterious than either drugs alone, as seen by the decreased BDNF level in all brain areas, but not in the striatum for alcohol or smoke alone. We do not discard that reduced BDNF levels in the striatum for combined use is related to dysregulation in the corticostriatal BDNF pathway and may partially justify why smokers drink more than non-smokers and alcoholics are frequently smokers. Additionally, in a previous study we found that cell proliferation was impaired in the hippocampus after combined alcohol and cigarette use (Gomez et al., 2015). Coincidentally, the perceptual decrease in the cell proliferation rate and BDNF levels were similar in both studies, as seen by the lower 60% and 65%, respectively, confirming the harmful effect of drinking and smoking. In humans, a magnetic resonance imaging (MRI) study showed that combined use of alcohol

and cigarette significantly decreased thickness (- 5%) in different brain areas when compared with alcoholics (- 2.5%) or control individuals (Durazzo et al., 2013).

Concerning the inflammatory response, we showed that combined use increased both TNF- α and IL-1 β cytokines in all brain areas studies, except for TNF- α in the striatum. According to doses, alcohol use have been related to the deactivation of transcription factors as the cAMP responsive element binding protein (CREB), which protects neurons from excitotoxicity, and to the activation of the nuclear factor κ B (NF κ B), which promotes inflammatory response, both important for neuronal survival (Crews and Ventreno, 2012). Indeed, alcohol increases DNA binding to NF κ B and reduces binding to CREB, increasing the risk of neurodegeneration (Crews et al., 2015; Gomez et al., 2015). Activation of NF κ B is associated with increases in TNF- α , a key pro-inflammatory cytokine, that induces the secretion of other cytokines, as IL-1 β , in cells and tissues. Additionally, alcohol directly activates the IL-1 β receptor type I and the toll-like receptor type 4 (IL-1RI/TLR-4) receptor in microglia, promoting cytokine secretion (Alfonso-Loeches et al., 2010; Blanco et al., 2008). Here we showed that alcohol administration increased TNF- α and IL-1 β levels in all brain areas studied, except for IL-1 β in the striatum. Results from others also show that chronic alcohol administration increases TNF- α and IL-1 β levels in the cortex, striatum, and hippocampus of rodents (Flora et al., 2005; Pascual et al., 2015; Qin et al., 2008; Tiwari and Chopra, 2013), as well NF- κ B and caspase-3 in the cortex and in the hippocampus of rats (Tiwari and Chopra, 2013). Although the consensus about the inflammatory damage of cigarette smoke in the periphery (Arnson et al., 2010; Lee et al., 2012), few studies explored the effect of cigarette smoke in the CNS. Indeed, a recent review mentioned that is undeniable the relationship between cigarette smoke and risk for neurological disorders in spite of specific mechanisms are not well clarified (G et al., 2017). In humans, neuroimaging studies show that cigarette smoke habit is associated with increased blood–brain barrier (BBB)

disruption and lesion volumes, and brain atrophy in multiple sclerosis patients (Zivadinov et al., 2009). Cigarette smoke also induces dysfunction in brain white matter of chronically exposure mice, associate with lipid peroxidation, protein oxidative injury, and alterations in myelin lipid composition (Nunez et al., 2016; Yu et al., 2016). Our results showed, for the first time, that cigarette smoke increases pro-inflammatory responses in different brain areas, parallel to reduced BDNF levels. Different from alcohol use, cigarette smoke alone increased TNF- α and IL-1 β levels in the striatum and hippocampus, but did not changed them in the frontal cortex. However, when alcohol was added to cigarette smoke, inflammatory response was intensified, except for TNF- α in the hippocampus. Thus, we may infer that, as for the alcohol, cigarette smoke also deflagrate inflammatory cascades in the brain and the combined use may add risk for neurological disorders.

Oxidative stress and inflammation are closely related, namely oxidative stress-induced inflammatory cascades causes the inflammation, which in turn increases oxidative stress (Biswas, 2016). However, we found only higher ROS in the hippocampus after combined use, and lower GSH levels was found in the hippocampus and striatum mainly related to alcohol administration. Oxidative stress and stimulus of neuroinflammatory and neuroapoptotic pathways have been largely associated with the neurotoxic effect of alcohol (Crews and Vetreno, 2014; Das and Vasudevan, 2007; Haorah et al., 2008; Hernández et al., 2016). Alcohol accelerate oxidative mechanisms directly, via increased production of ROS, and indirectly, by impairing antioxidant mechanisms in peripheral and CNS, according to doses, regime of administration, or tissue studied (Bondy and Guo, 1995; Fowler et al., 2014; Somani and Husain, 1997; Zhong et al., 2012; Das and Vasudevan, 2007). Oxidative stress increases after oral alcohol administration, 2 g/kg/day, for 45 days in the cortex, with no changes in the striatum, cerebellum, and medulla of rats (Somani and Husain, 1997). In that study, increasing on ROS counterpart with decreasing on GSH levels in the cortex, contrary to

others that do not find changes in ROS or GSH levels in the cortical area after 12 days of feed-alcohol treatment (Bondy and Guo, 1995). Indeed, we showed that alcohol decreased ROS and GSH levels in the striatum and serum, denoting an imbalance between pro- and antioxidant defenses only in these tissues. In the hippocampus, alcohol did not change ROS levels, but GSH was lower in AL than CT rats. In the same brain area, ROS increases and GSH levels decrease after oral administration of 2 or 3 g/kg alcohol, for 3 or 4 weeks, with no changes on cortical area (Motaghinejad et al., 2017; Zhong et al., 2012). Those authors also show a positive correlation between ROS production and the CYP2E1 expression (Zhong et al., 2012), an enzyme involved in the alcohol metabolism and production of superoxide anion radical and hydrogen peroxide (H₂O₂) (Das and Vasudevan, 2007). Concerning cigarette smoke, we showed that daily exposure to smoke of 12 cigarettes, along 4 weeks, significantly decreased ROS levels in the hippocampus and striatum, with no changes on frontal cortex and serum of rats. However, lower ROS levels were combined with lower GSH levels in the hippocampus, suggesting that in this specific brain area neurons were insulted by smoke, stimulating their antioxidant defenses. As abovementioned, cigarette smoke comprises several chemical compounds as many species of oxidants and free radicals, capable of initiating or promoting oxidative damage in different tissues, contributing in the pathogenesis of cigarette smoking-induced toxicity (Church and Pryor, 1985). Preclinical studies show that exposure to smoke of 7-10 cigarettes/day, for 12 weeks, increases lipid peroxidation and decrease some antioxidant parameters in the rat whole brain (Anbarasi et al., 2006; Ramesh et al., 2015). However, repeated smoke (1 h, twice a day, for 2 weeks) in infant mice shows different responses according to the brain area (Lobo Torres et al., 2012). On that infant mice, malondialdehyde (MDA), a biomarker of lipoperoxidation, does not change in the hippocampus, prefrontal cortex, or striatum, but glutathione reductase enzyme activity increases in the prefrontal cortex, and glutathione S-transferase activity increases in

prefrontal cortex and striatum (Lobo Torres et al., 2012). Curiously, we showed that smoke decreased ROS and increased GSH levels, denoting a neuroprotective effect of cigarette. Nicotine also shows a dual effect on oxidative parameters with moderate doses showing a neuroprotective effect in the striatum (nucleus accumbens), and a neurotoxic effect in the ventral tegmental area of rats (Song et al., 2016). Combined use (ALCS rats), on the other hand, significantly increased ROS and decreased GSH levels in the hippocampus, showing that this brain area was more responsive to oxidative damage by concomitant alcohol and cigarette use. However, chronic exposure to cigarette smoke (2 h/day, 4 weeks) did not show changes on lipid peroxidation or antioxidant enzyme activities in the hippocampus of rats (Delibas et al., 2003). Adding to the potential harmful effect of the combined use we showed that it prevented the decrease on ROS and increase GSH levels in the striatum, related to possible neuroprotective effect of cigarette in this brain area.

We showed here that AL, CS, or ALCS treatments decreased GS activity in the hippocampus, CS exposure decreasing it in the striatum and AL and CS treatments decreasing it in the frontal cortex, also evidencing a response according to treatment and brain area. This enzyme is critical for the metabolism of the glutamate, and its deficit has been linked to the generation of recurrent seizures in rats as a result of extracellular glutamate accumulation in astrocytic (Eid et al., 2008). Although considered not to be important in the regulation of GSH synthesis, stressful or pathological conditions reduce both GSH levels and GS activity (Lu, 2013). Here we did not detect correlation between GSH and GS, except in the hippocampus where both decreased. Alcohol use reduces GS activity in the hippocampus of immature rats after administration during pregnancy (Cesconetto et al., 2016) and in the striatum after 12 days of voluntary alcohol intake (Bondy and Guo, 1995). There are no results for cigarette smoke or nicotine, except that, *in situ*, nicotine decreases GS activity in glial cells (Lim and

Kim, 2003). Taking in account that GS is related to glutamate excitotoxicity we may infer that the hippocampus was the main area affected by the combined use.

Although we could detect changes on neurotrophic, inflammatory, and oxidative parameters, we did not show an association with behaviors. Under our experimental conditions, we did not find changes on short-term memory in our rats. Because BDNF levels were reduced in the hippocampus of our rats and, we could expect a cognitive decline and worst performance in the short-term memory test. Studies in humans and rodents are controversies since results are dependent of doses, administration regime and the experimental design. Here rats were trained after 3 hours from the last alcohol intake and 1 hour from the last cigarette smoke to avoid interferences of drugs in the acquisition memory. In a previous study, following the same experimental protocol we found that alcohol and cigarette smoke increase the long-term memory in rats (Gomez et al., 2015). Combined use of alcohol (2 g/kg, i.p.) and cigarette smoke (8 h/day) for 5 days decreases the short-term memory in mice trained and tested during the exposure (Abreu-Villaça et al., 2013). On the other hand, acute alcohol (1.5 g/kg, i.p.) and nicotine (0.30 mg/kg, s.c.) administration improves the memory of rats tested in the 8-arm radial maze (Rezvani and Levin, 2002). In humans, results are controversies, since studies found that combined use of alcohol and cigarette decreases the short-term memory compared with cigarette alone (Schuster et al., 2016) or alcohol intake does not affect the worst performance of smokers tested immediately after smoke (Greenstein et al., 2010).

Because of the morbidity and mortality associated with both alcohol and tobacco abuse, it is important to address studies exploring the effect of their combined use. Here we focused on the effect of the combined use in the CNS and globally found that it increased inflammatory response and decreased neurogenesis more importantly when compared with the use of alcohol or cigarette alone. Additionally, we showed for the first time the effect of

cigarette smoke in the CNS. In spite of reactive species parameters in the hippocampus and striatum suggested a "neuroprotective-like" effect from smoke, inflammatory and neurotrophic parameters did not support this result. Thus, in the CNS, alcohol and cigarette use lead to major neurological risks when used alone and together. Although more studies need to be done, we confirm our hypothesis that combined use is more deleterious than alcohol and cigarette alone.

References

- Abreu-Villaça, Y., de Carvalho Graça, A.C., Ribeiro-Carvalho, A., Naiff, V. de F., Manhães, A.C., Filgueiras, C.C., 2013. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 15, 1211–1221. doi:10.1093/ntr/nts250
- Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A.M., Sanchez-Vera, I., Guerri, C., 2010. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 8285–8295. doi:10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010
- Anbarasi, K., Vani, G., Balakrishna, K., Devi, C.S.S., 2006. Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci.* 78, 1378–1384. doi:10.1016/j.lfs.2005.07.030
- Anstey, K.J., von Sanden, C., Salim, A., O’Kearney, R., 2007. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Epidemiol.* 166, 367–378. doi:10.1093/aje/kwm116

- Arnson, Y., Shoenfeld, Y., Amital, H., 2010. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 34, J258-265. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.003
- Bernardin, F., Maheut-Bosser, A., Paille, F., 2014. Cognitive impairments in alcohol-dependent subjects. *Front. Psychiatry* 5, 78. doi:10.3389/fpsyt.2014.00078
- Bhang, S.-Y., Choi, S.-W., Ahn, J.-H., 2010. Changes in plasma brain-derived neurotrophic factor levels in smokers after smoking cessation. *Neurosci. Lett.* 468, 7–11. doi:10.1016/j.neulet.2009.10.046
- Binder, D.K., Scharfman, H.E., 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* Chur Switz. 22, 123–131.
- Blanco, A.M., Perez-Arago, A., Fernandez-Lizarbe, S., Guerri, C., 2008. Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells. *J. Neurochem.* 106, 625–639. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05425.x
- Bobo, J.K., Husten, C., 2000. Sociocultural influences on smoking and drinking. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* 24, 225–232.
- Bondy, S.C., Guo, S.X., 1995. Regional selectivity in ethanol-induced pro-oxidant events within the brain. *Biochem. Pharmacol.* 49, 69–72.
- Browne, R.W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 108, 347–352. doi:10.1385/0-89603-472-0:347
- Cesconetto, P.A., Andrade, C.M., Cattani, D., Domingues, J.T., Parisotto, E.B., Filho, D.W., Zamoner, A., 2016. Maternal Exposure to Ethanol During Pregnancy and Lactation Affects Glutamatergic System and Induces Oxidative Stress in Offspring Hippocampus. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40, 52–61. doi:10.1111/acer.12917

- Church, D.F., Pryor, W.A., 1985. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* 64, 111–126.
- Crews, F.T., Sarkar, D.K., Qin, L., Zou, J., Boyadjieva, N., Vetreno, R.P., 2015. Neuroimmune Function and the Consequences of Alcohol Exposure. *Alcohol Res. Curr. Rev.* 37, 331–341, 344–351.
- Crews, F.T., Vetreno, R.P., 2014. Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *Int. Rev. Neurobiol.* 118, 315–357. doi:10.1016/B978-0-12-801284-0.00010-5
- Das, S.K., Vasudevan, D.M., 2007. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* 81, 177–187. doi:10.1016/j.lfs.2007.05.005
- Delibas, N., Ozcankaya, R., Altuntas, I., Sutcu, R., 2003. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and NMDA receptor subunits 2A and 2B concentration in rat hippocampus. *Cell Biochem. Funct.* 21, 69–73. doi:10.1002/cbf.990
- Dinarello, C.A., 2007. Historical Review of Cytokines. *Eur. J. Immunol.* 37, S34–S45. doi:10.1002/eji.200737772
- dos Santos, A.Q., Nardin, P., Funchal, C., de Almeida, L.M.V., Jacques-Silva, M.C., Wofchuk, S.T., Gonçalves, C.-A., Gottfried, C., 2006. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 453, 161–167. doi:10.1016/j.abb.2006.06.025
- Durazzo, T.C., Meyerhoff, D.J., Nixon, S.J., 2012. A comprehensive assessment of neurocognition in middle-aged chronic cigarette smokers. *Drug Alcohol Depend.* 122, 105–111. doi:10.1016/j.drugalcdep.2011.09.019
- Durazzo, T.C., Mon, A., Gazdzinski, S., Meyerhoff, D.J., 2013. Chronic cigarette smoking in alcohol dependence: associations with cortical thickness and N-acetylaspartate levels in the extended brain reward system. *Addict. Biol.* 18, 379–391. doi:10.1111/j.1369-1600.2011.00407.x

- Ebada, M.E., Latif, L.M., Kendall, D.A., Pardon, M.C., 2014. Corticosterone protects against memory impairments and reduced hippocampal BDNF levels induced by a chronic low dose of ethanol in C57BL/6J mice. *Romanian J. Morphol.Embryol. Rev. Roum. Morphol.Embryol.* 55, 1303–1316.
- Eid, T., Ghosh, A., Wang, Y., Beckström, H., Zaveri, H.P., Lee, T.-S.W., Lai, J.C.K., Malthankar-Phatak, G.H., de Lanerolle, N.C., 2008.Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats. *Brain* 131, 2061–2070. doi:10.1093/brain/awn133
- Eruslanov, E., Kusmartsev, S., 2010. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 594, 57–72. doi:10.1007/978-1-60761-411-1_4
- Fernandez, G.M., Stewart, W.N., Savage, L.M., 2016. Chronic Drinking During Adolescence Predisposes the Adult Rat for Continued Heavy Drinking: Neurotrophin and Behavioral Adaptation after Long-Term, Continuous Ethanol Exposure. *PloS One* 11, e0149987. doi:10.1371/journal.pone.0149987
- Flora, G., Pu, H., Lee, Y.W., Ravikumar, R., Nath, A., Hennig, B., Toborek, M., 2005.Proinflammatory synergism of ethanol and HIV-1 Tat protein in brain tissue. *Exp. Neurol.* 191, 2–12. doi:10.1016/j.expneurol.2004.06.007
- Fowler, A.-K., Thompson, J., Chen, L., Dagda, M., Dertien, J., Dossou, K.S.S., Moaddel, R., Bergeson, S.E., Kruman, I.I., 2014.Differential sensitivity of prefrontal cortex and hippocampus to alcohol-induced toxicity. *PloS One* 9, e106945. doi:10.1371/journal.pone.0106945
- G, S.B.A., Choi, S., Krishnan, J., K, R., 2017. Cigarette smoke and related risk factors in neurological disorders: An update. *Biomed.Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 85, 79–86. doi:10.1016/j.biopha.2016.11.118

- Geil, C.R., Hayes, D.M., McClain, J.A., Liput, D.J., Marshall, S.A., Chen, K.Y., Nixon, K., 2014. Alcohol and adult hippocampal neurogenesis: promiscuous drug, wanton effects. *Prog.Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 54, 103–113. doi:10.1016/j.pnpbp.2014.05.003
- Gomez, R., Schneider, R., Quinteros, D., Santos, C.F., Bandiera, S., Thiesen, F.V., Coitinho, A.S., Fernandes, M. da C., Wieczorek, M.G., 2015.Effect of Alcohol and Tobacco Smoke on Long-Term Memory and Cell Proliferation in the Hippocampus of Rats.*Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 17, 1442–1448. doi:10.1093/ntr/ntv051
- González-Quintela, A., Dominguez-Santalla, M.J., Pérez, L.F., Vidal, C., Lojo, S., Barrio, E., 2000. Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. *Cytokine* 12, 1437–1440. doi:10.1006/cyto.2000.0715
- González-Reimers, E., Santolaria-Fernández, F., Martín-González, M.C., Fernández-Rodríguez, C.M., Quintero-Platt, G., 2014. Alcoholism: a systemic proinflammatory condition. *World J. Gastroenterol.* 20, 14660–14671. doi:10.3748/wjg.v20.i40.14660
- Greenstein, J.E., Kassel, J.D., Wardle, M.C., Veilleux, J.C., Evatt, D.P., Heinz, A.J., Roesch, L.L., Braun, A.R., Yates, M.C., 2010. The separate and combined effects of nicotine and alcohol on working memory capacity in nonabstinent smokers. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 18, 120–128. doi:10.1037/a0018782
- Haorah, J., Ramirez, S.H., Floreani, N., Gorantla, S., Morsey, B., Persidsky, Y., 2008.Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1542–1550. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.030
- Hernández, J.A., López-Sánchez, R.C., Rendón-Ramírez, A., 2016. Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. *Oxid. Med. Cell. Longev.*2016, 1543809. doi:10.1155/2016/1543809

- Jang, M.-H., Shin, M.-C., Jung, S.-B., Lee, T.-H., Bahn, G.-H., Kwon, Y.K., Kim, E.-H., Kim, C.-J., 2002. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport* 13, 1509–1513.
- Jeanblanc, J., He, D.-Y., Carnicella, S., Kharazia, V., Janak, P.H., Ron, D., 2009. Endogenous bdnf in the dorsolateral striatum gates alcohol drinking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 13494–13502. doi:10.1523/JNEUROSCI.2243-09.2009
- Joe, K.-H., Kim, Y.-K., Kim, T.-S., Roh, S.-W., Choi, S.-W., Kim, Y.-B., Lee, H.-J., Kim, D.-J., 2007. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcohol.Clin. Exp. Res.* 31, 1833–1838. doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00507.x
- Khanna, A., Guo, M., Mehra, M., Royal, W., 2013. Inflammation and oxidative stress induced by cigarette smoke in Lewis rat brains. *J. Neuroimmunol.* 254, 69–75. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.09.006
- Kim, J.W., Lee, D.Y., Lee, B.C., Jung, M.H., Kim, H., Choi, Y.S., Choi, I.-G., 2012. Alcohol and cognition in the elderly: a review. *Psychiatry Investig.* 9, 8–16. doi:10.4306/pi.2012.9.1.8
- Lee, J., Taneja, V., Vassallo, R., 2012. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J. Dent. Res.* 91, 142–149. doi:10.1177/0022034511421200
- Lim, D.K., Kim, H.S., 2003. Opposite modulation of glutamate uptake by nicotine in cultured astrocytes with/without cAMP treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 476, 179–184.
- Lobo Torres, L.H., Moreira, W.L., Tamborelli Garcia, R.C., Annoni, R., Nicoletti Carvalho, A.L., Teixeira, S.A., Pacheco-Neto, M., Muscará, M.N., Camarini, R., de Melo Loureiro, A.P., Yonamine, M., Mauad, T., Marcourakis, T., 2012. Environmental tobacco smoke induces oxidative stress in distinct brain regions of infant mice. *J. Toxicol. Environ. Health A* 75, 971–980. doi:10.1080/15287394.2012.695985

- Logrip, M.L., Barak, S., Warnault, V., Ron, D., 2015. Corticostriatal BDNF and alcohol addiction. *Brain Res.* 1628, 60–67. doi:10.1016/j.brainres.2015.03.025
- Logrip, M.L., Janak, P.H., Ron, D., 2009. Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. *J. Neurochem.* 109, 1459–1468. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06073.x
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3143–3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008
- MacLennan, A.J., Lee, N., Walker, D.W., 1995. Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 197, 105–108.
- Mechtcheriakov, S., Brenneis, C., Egger, K., Koppelstaetter, F., Schocke, M., Marksteiner, J., 2007. A widespread distinct pattern of cerebral atrophy in patients with alcohol addiction revealed by voxel-based morphometry. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78, 610–614. doi:10.1136/jnnp.2006.095869
- Motaghinejad, M., Motevalian, M., Fatima, S., Hashemi, H., Gholami, M., 2017. Curcumin confers neuroprotection against alcohol-induced hippocampal neurodegeneration via CREB-BDNF pathway in rats. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 87, 721–740. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.020
- Nunez, K., Kay, J., Krotow, A., Tong, M., Agarwal, A.R., Cadenas, E., de la Monte, S.M., 2016. Cigarette Smoke-Induced Alterations in Frontal White Matter Lipid Profiles Demonstrated by MALDI-Imaging Mass Spectrometry: Relevance to Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 51, 151–163. doi:10.3233/JAD-150916
- Oliveira-da-Silva, A., Vieira, F.B., Cristina-Rodrigues, F., Filgueiras, C.C., Manhães, A.C., Abreu-Villaça, Y., 2009. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int. J. Dev.*

- Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci. 27, 539–548. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.06.009
- Pascual, M., Baliño, P., Aragón, C.M.G., Guerri, C., 2015. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology* 89, 352–359. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.10.014
- Pomerleau, C.S., Aubin, H.J., Pomerleau, O.F., 1997. Self-reported alcohol use patterns in a sample of male and female heavy smokers. *J. Addict. Dis.* 16, 19–24. doi: 10.1300/J069v16n03_02
- Qin, L., He, J., Hanes, R.N., Pluzarev, O., Hong, J.-S., Crews, F.T., 2008. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J. Neuroinflammation* 5, 10. doi:10.1186/1742-2094-5-10
- Ramesh, T., Sureka, C., Bhuvana, S., Begum, V.H., 2015. Oxidative stress in the brain of cigarette smoke-induced noxiousness: neuroprotective role of *Sesbania grandiflora*. *Metab. Brain Dis.* 30, 573–582. doi:10.1007/s11011-014-9614-4
- Rezvani, A.H., Levin, E.D., 2002. Nicotine-alcohol interactions and cognitive function in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 865–872.
- Rose, C.F., Verkhatsky, A., Parpura, V., 2013. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1518–1524. doi:10.1042/BST20130237
- Schuster, R.M., Mermelstein, R.J., Hedeker, D., 2016. Ecological momentary assessment of working memory under conditions of simultaneous marijuana and tobacco use. *Addict. Abingdon Engl.* 111, 1466–1476. doi:10.1111/add.13342
- Somani, S.M., Husain, K., 1997. Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on antioxidant system of rat brain regions. *J. Appl. Toxicol. JAT* 17, 329–336.

- Song, G., Nesil, T., Cao, J., Yang, Z., Chang, S.L., Li, M.D., 2016. Nicotine mediates expression of genes related to antioxidant capacity and oxidative stress response in HIV-1 transgenic rat brain. *J. Neurovirol.* 22, 114–124. doi:10.1007/s13365-015-0375-6
- Tiwari, V., Chopra, K., 2013. Resveratrol abrogates alcohol-induced cognitive deficits by attenuating oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in the adult rat brain. *Neurochem. Int.* 62, 861–869. doi:10.1016/j.neuint.2013.02.012
- Tuon, T., Valvassori, S.S., Lopes-Borges, J., Fries, G.R., Silva, L.A., Kapczinski, F., Quevedo, J., Pinho, R.A., 2010. Effects of moderate exercise on cigarette smoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice. *Neurosci.Lett.* 475, 16–19. doi:10.1016/j.neulet.2010.03.030
- WHO, 2016. World Health Organization (WHO)|Tobacco [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/> (accessed 1.2.17).
- WHO, 2014.WHO | Global Status Report on Alcohol and Health 2014 [WWW Document].WHO. URL http://www.who.int/substance_abuse/publications/alcohol_2014/en/ (accessed 1.13.17).
- Xiao, L., Kish, V.L., Benders, K.M., Wu, Z.-X., 2015. Prenatal and Early Postnatal Exposure to Cigarette Smoke Decreases BDNF/TrkB Signaling and Increases Abnormal Behaviors Later in Life. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19. doi:10.1093/ijnp/pyv117
- York, J.L., Hirsch, J.A., 1995. Drinking patterns and health status in smoking and nonsmoking alcoholics.*Alcohol.Clin. Exp. Res.* 19, 666–673.
- Yu, R., Deochand, C., Krotow, A., Leão, R., Tong, M., Agarwal, A.R., Cadenas, E., de la Monte, S.M., 2016. Tobacco Smoke-Induced Brain White Matter Myelin Dysfunction: Potential Co-Factor Role of Smoking in Neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis. JAD* 50, 133–148. doi:10.3233/JAD-150751

Zhong, Y., Dong, G., Luo, H., Cao, J., Wang, C., Wu, J., Feng, Y.-Q., Yue, J., 2012. Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem. *Toxicology* 302, 275–284. doi:10.1016/j.tox.2012.08.009

Zivadinov, R., Weinstock-Guttman, B., Hashmi, K., Abdelrahman, N., Stosic, M., Dwyer, M., Hussein, S., Durfee, J., Ramanathan, M., 2009. Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology* 73, 504–510. doi:10.1212/WNL.0b013e3181b2a706

Legends of figures

Figure 1.Timeline from experimental procedures. Alcohol was administered immediately before the cigarette smoke exposure and the procedure was repeated at 9 am and 2 pm.

Figure 2.Brain-derived neurotrophic factor(BDNF) levels in different brain areas of rats after alcohol use (AL, 4 g/kg/day, orally), cigarette smoke exposure (CS, 12 cigarettes/day, inhalation), or their combined use (ALCS), along 28 days. CT: control group. The data are presented as mean \pm S.E.M., (n = 6 – 7). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Different letters indicate statistical differences (P < 0.005).

Figure 3.Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) levels in different brain areas of rats after alcohol use (AL, 4 g/kg/day, orally), cigarette smoke exposure (CS, 12 cigarettes/day, inhalation), or their combined use (ALCS), along 28 days. CT: control group. The data are presented as mean \pm S.E.M., (n = 6 – 7). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Different letters indicate statistical differences (P < 0.005).

Figure 4.Interleukin 1 beta (IL-1 β) levels in different brain areas of rats after alcohol use (AL, 4 g/kg/day, orally), cigarette smoke exposure (CS, 12 cigarettes/day, inhalation), or their combined use (ALCS), along 28 days. CT: control group. The data are presented as mean \pm S.E.M., (n = 6 – 7). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Different letters indicate statistical differences (P < 0.005).

Figure 5.Reactive oxygen species (ROS) production in different brain areas and serum of rats after alcohol use (AL, 4 g/kg/day, orally), cigarette smoke exposure (CS, 12 cigarettes/day, inhalation), or their combined use (ALCS), along 28 days. CT: control group. The data are

presented as mean \pm S.E.M., (n = 6 – 7). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Different letters indicate statistical differences (P < 0.005).

Figure 6. Glutathione (GSH) levels in different brain areas and serum of rats after alcohol use (AL, 4 g/kg/day, orally), cigarette smoke exposure (CS, 12 cigarettes/day, inhalation), or their combined use (ALCS), along 28 days. CT: control group. The data are presented as mean \pm S.E.M., (n = 6 – 7). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Different letters indicate statistical differences (P < 0.005).

Figure 7. Glutamine synthetase (GS) activity in different brain areas of rats after alcohol use (AL, 4 g/kg/day, orally), cigarette smoke exposure (CS, 12 cigarettes/day, inhalation), or their combined use (ALCS), along 28 days. CT: control group. The data are presented as mean \pm S.E.M., (n = 6 – 7). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Different letters indicate statistical differences (P < 0.005).

Figure 8. Short-term memory in rats after alcohol use (AL, 4 g/kg/day, orally), cigarette smoke exposure (CS, 12 cigarettes/day, inhalation), or their combined use (ALCS), along 28 days. CT: control group. A: step-down latency in the test session; B: memory index calculated as [latency in the test session/ latency in the (test + training) sessions] \times 100. The data are presented as mean \pm S.E.M., (n = 6 – 7). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Different letters indicate statistical differences (P < 0.005).

Figure 1

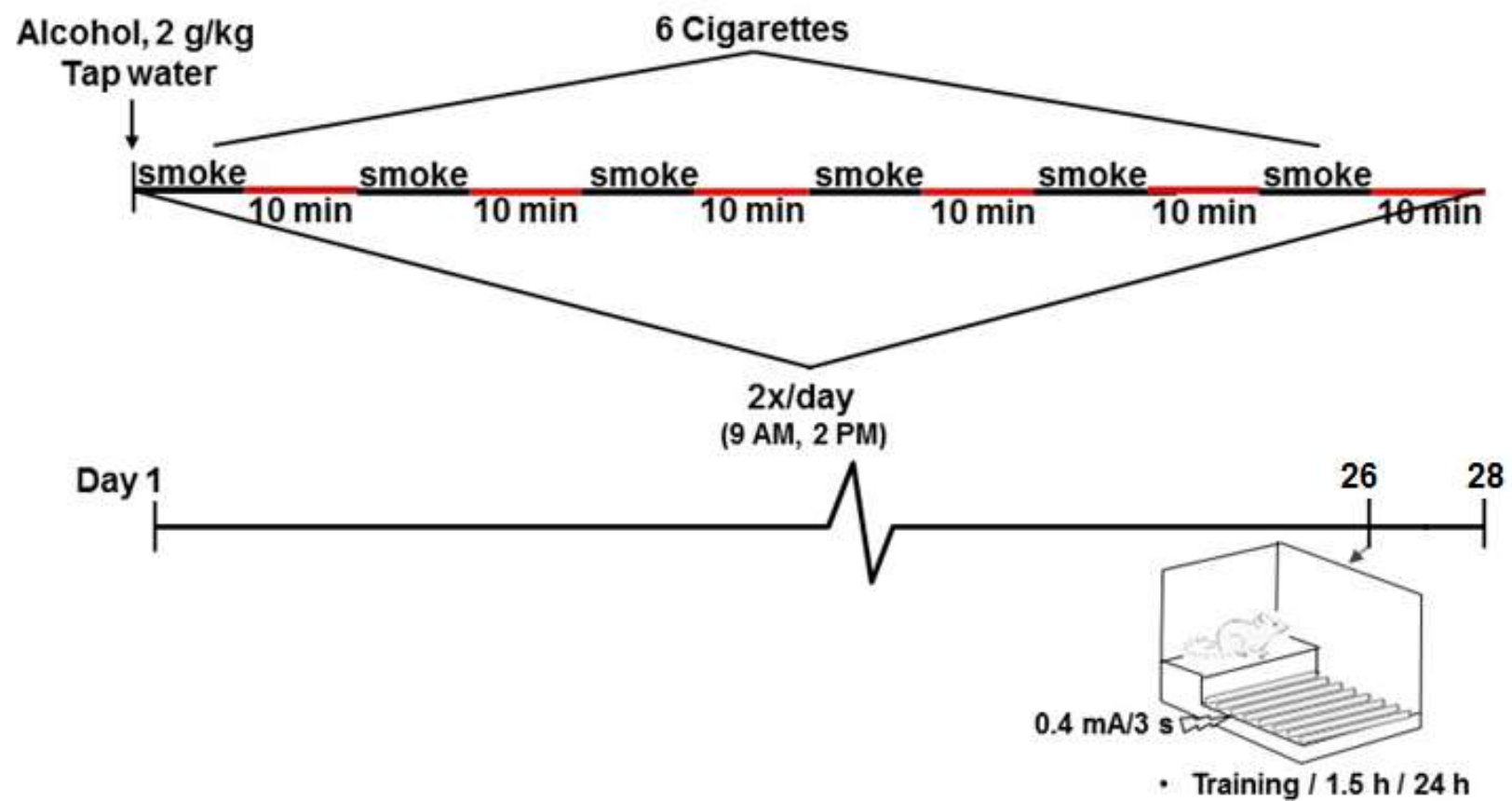


Figure 2

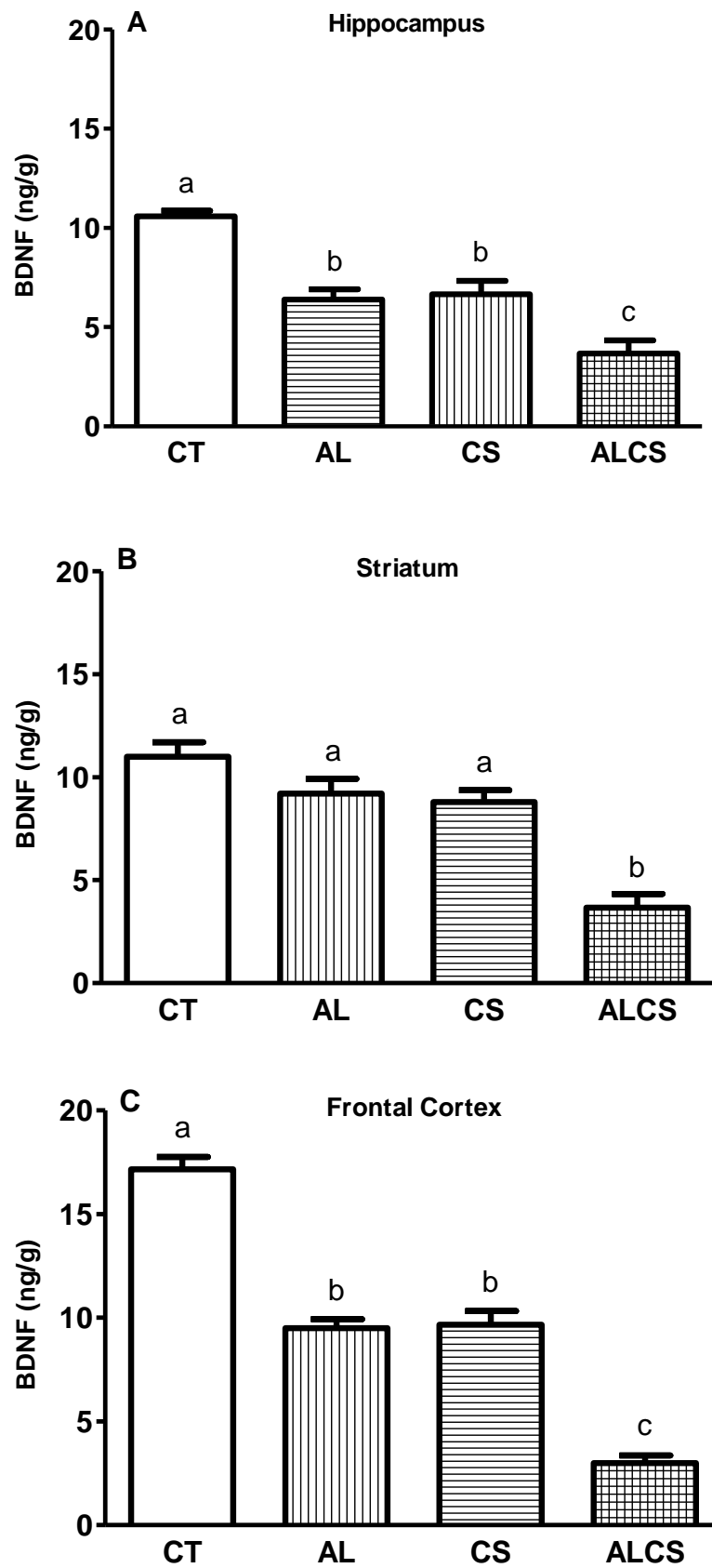


Figure 3

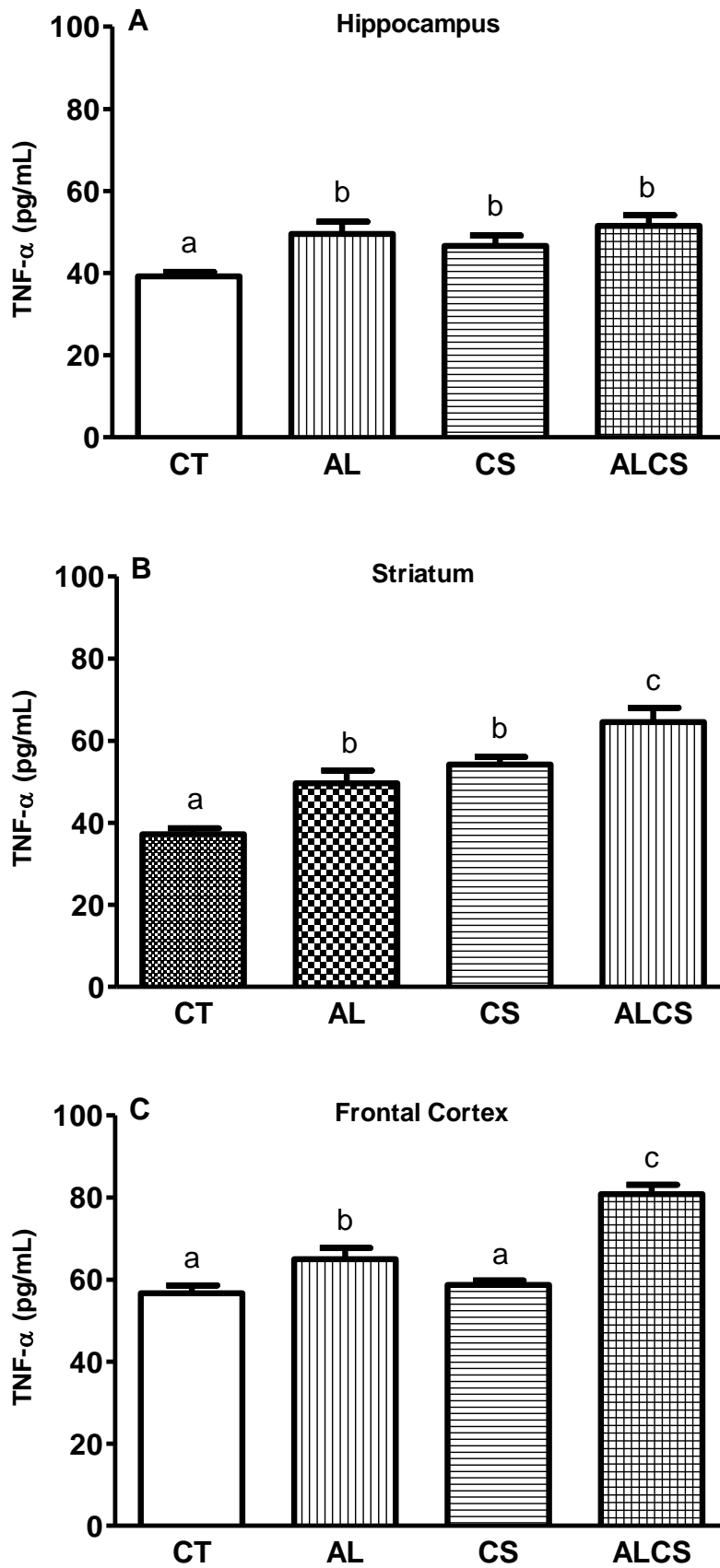


Figure 4

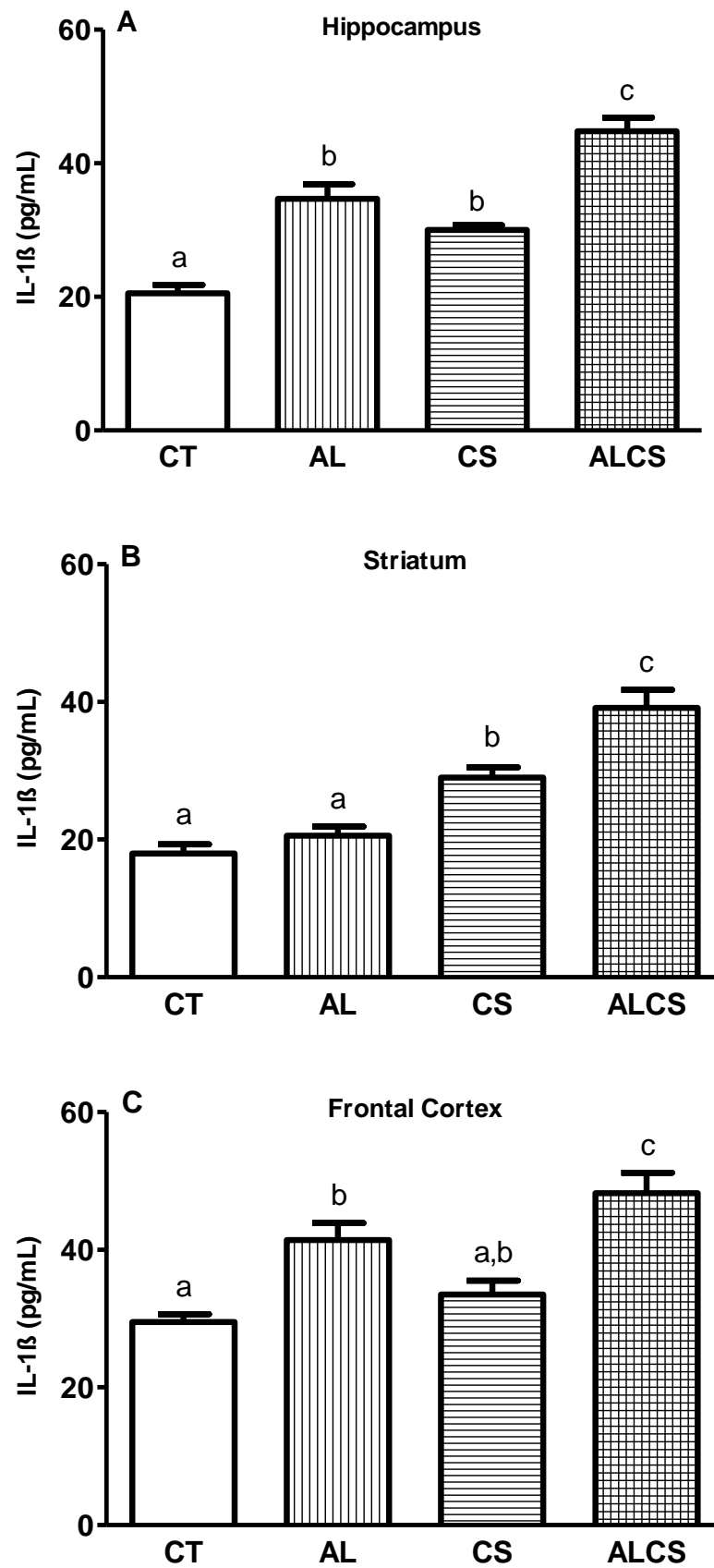


Figure 5

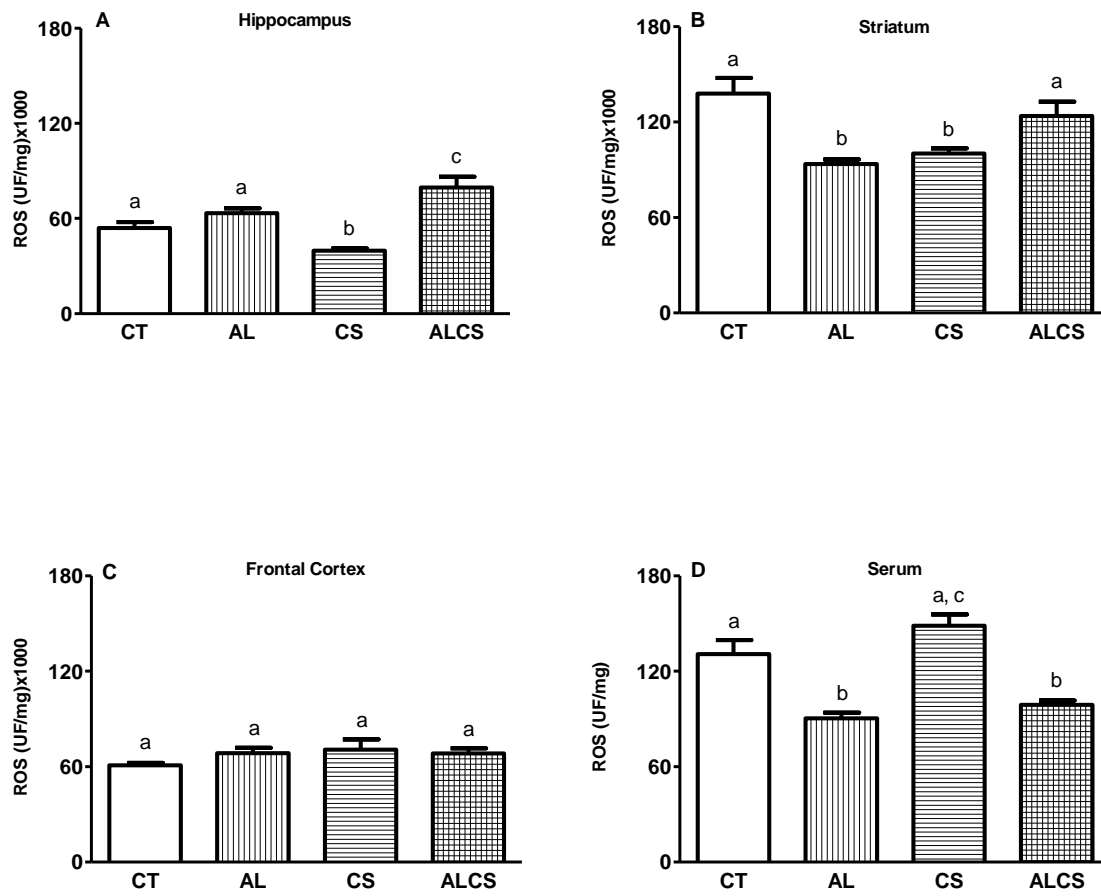


Figure 6

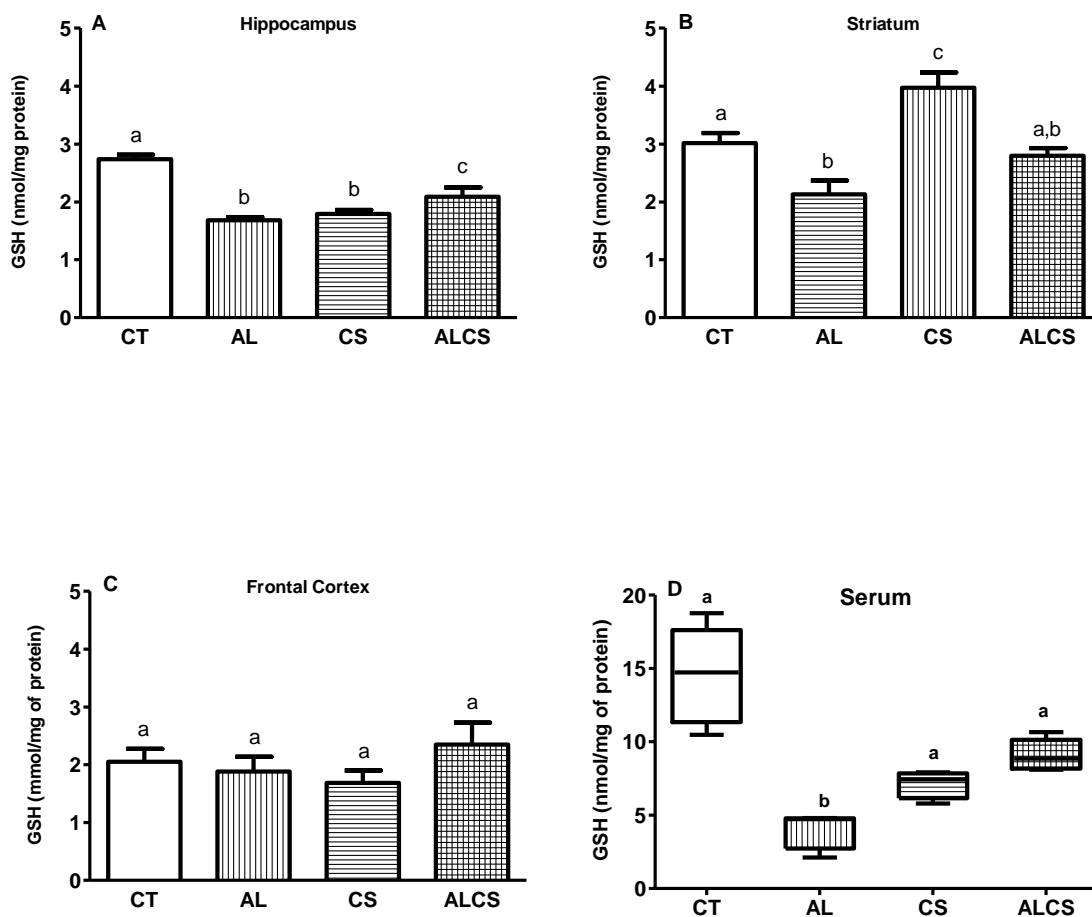


Figure 7

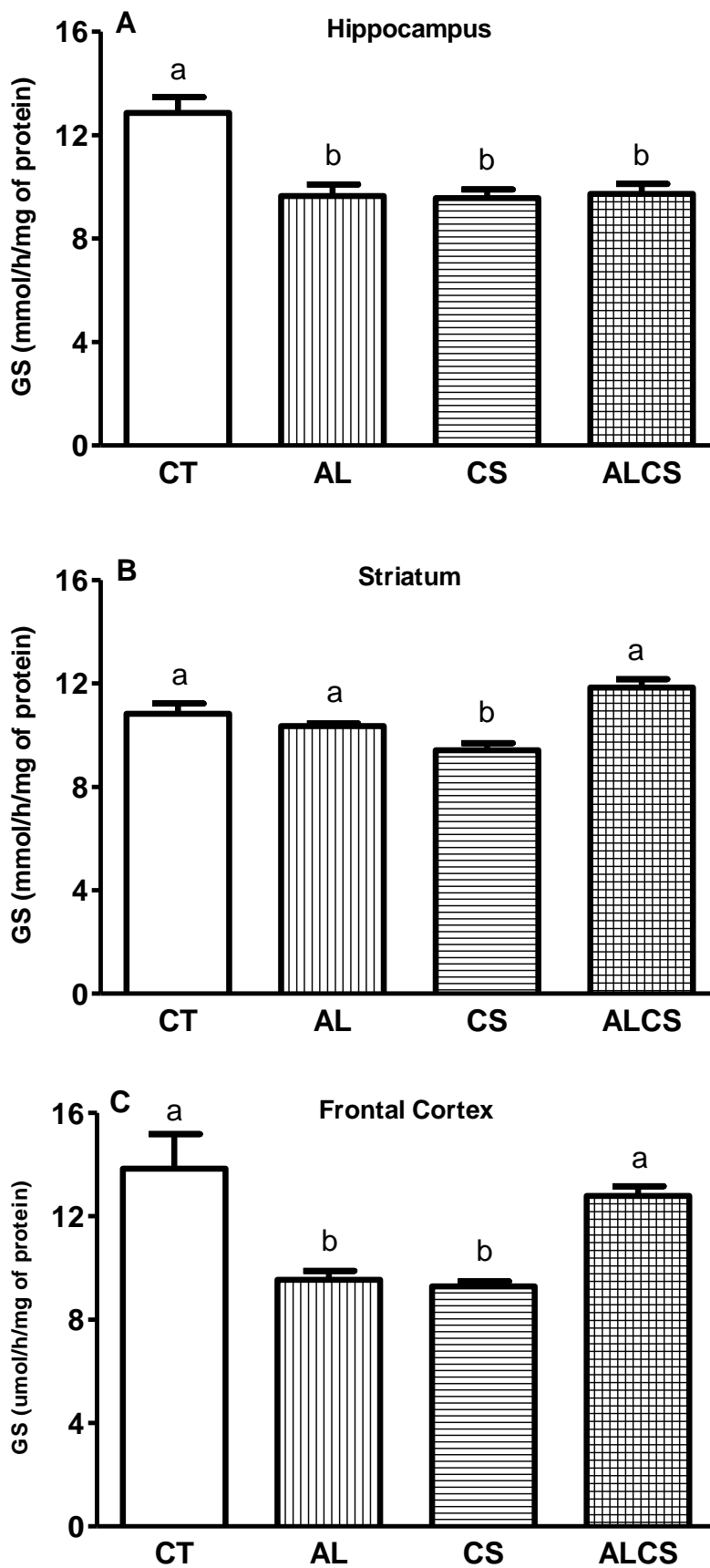
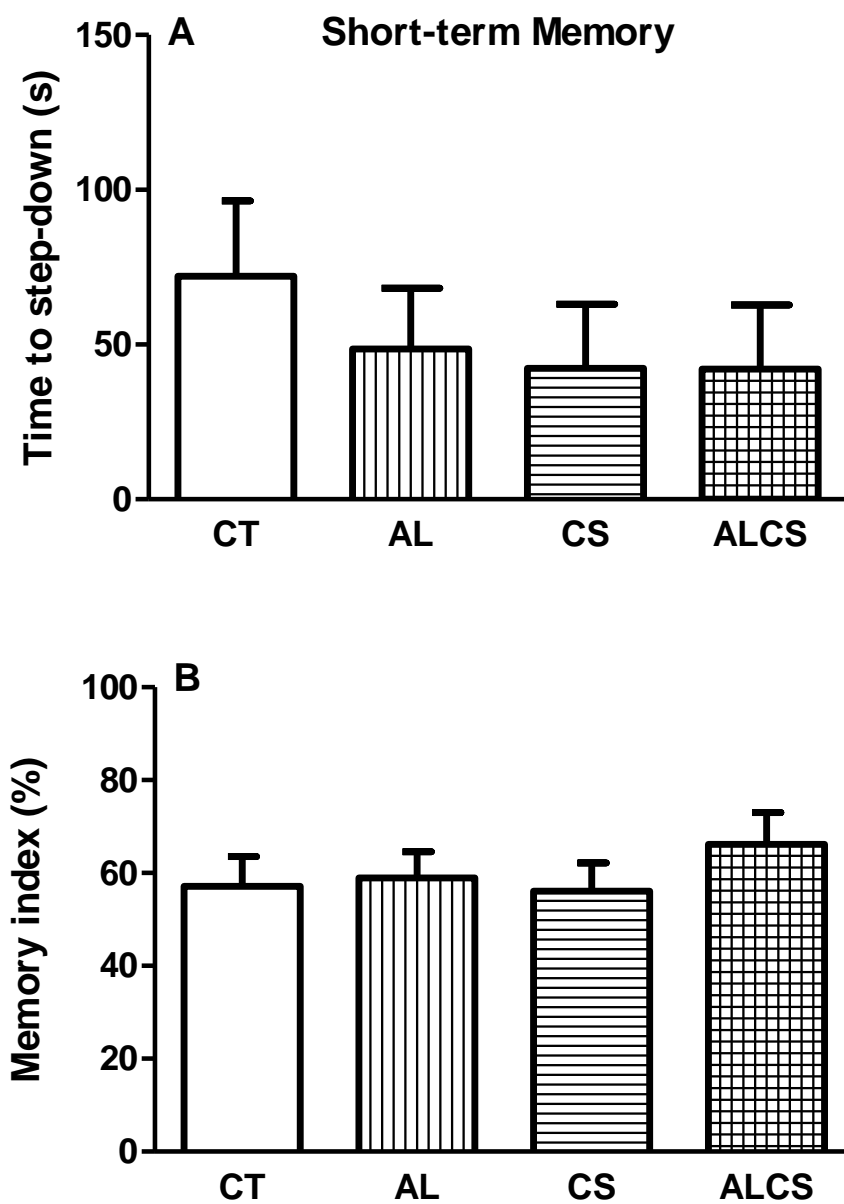


Figure 8



4. RESULTADOS COMPLEMENTARES

Ao longo do experimento descrito na Parte II desta dissertação e apresentado no formato de artigo, monitoramos outros parâmetros como peso corporal, bem com o consumo de água e ração dos animais. Como esperado e representado na Figura 7, houve aumento no peso dos ratos ao longo das quatro semanas. No entanto, o ganho médio de peso foi menor para os ratos dos grupos expostos à fumaça de cigarro (TB) ou sua associação (ALTB), quando comparados ao grupo controle (CT) ou álcool (AL). De fato, após a 4ª semana, o ganho de peso total dos animais dos grupos CT e AL foi de cerca de 21 g, enquanto que os que do grupo TAB e ALTB ganharam apenas 16 g (Figura 7).

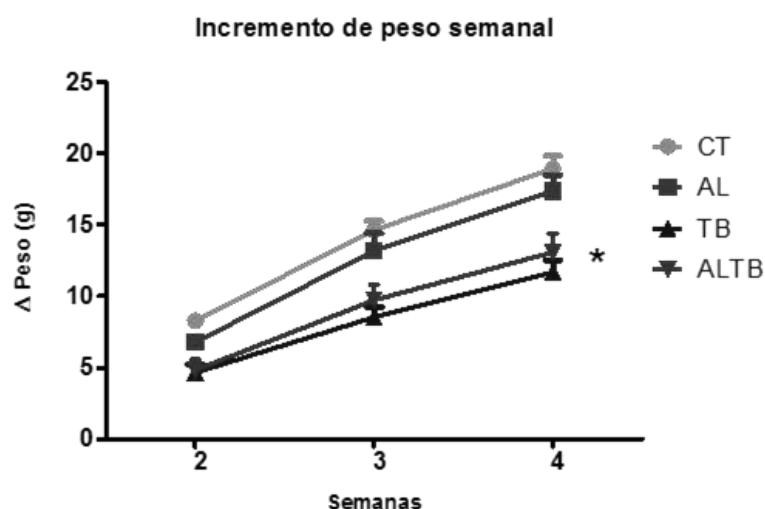


Figura 7. Ganho de peso médio semanal de ratos tratados com álcool (4g/kg/dia), via oral e expostos à fumaça de 12 cigarros/dia, via inalatória ou sua associação, por 28 dias. n = 12/grupo; ANOVA-2 vias de medidas repetidas + Bonferroni. * diferente dos demais grupos na mesma semana, $P < 0,001$.

Apesar de todos os ratos ganharem peso, a ingestão de alimento reduziu cerca de 1,5 g ao longo do experimento (Figura 8). A média do consumo de ração no grupo AL foi 27% menor do que a ingestão diária de ração pelos ratos dos grupos os grupos ALC e ALTB na segunda semana de tratamento. Durante o resto do período houve um aumento gradual no consumo de ração, mas este ainda foi menor que o consumo dos animais CT. Em contrataste, na quarta semana, o grupo ALTB

apresentou uma redução significativa do consumo, quando comparado aos demais grupos. O grupo TAB apresentou consumo médio muito próximo ao grupo controle.

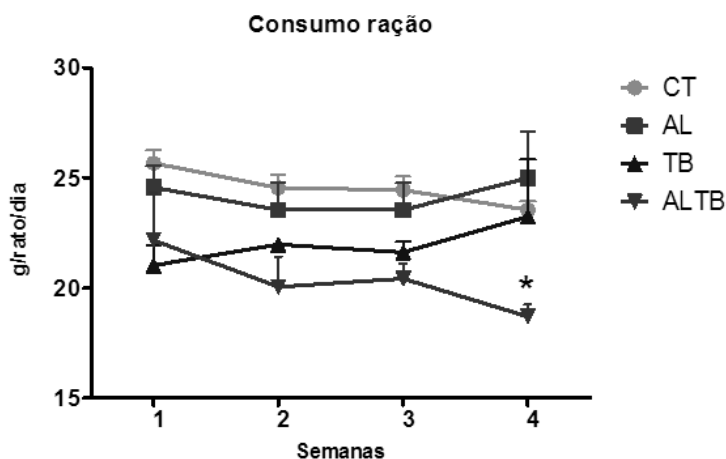


Figura 8. Consumo médio semanal de ração de ratos tratados com álcool (4g/kg/dia), via oral, expostos à fumaça de 12 cigarros/dia, via inalatória, ou sua associação, por 28 dias. n = 12/grupo; ANOVA-2 vias de medidas repetidas + Bonferroni. * diferente dos demais grupos na mesma semana, P < 0,001.

Para a ingestão de água (Figura 9), observamos que na 1ª a 3ª semana os animais do grupo ALC consumiram em média 10% mais água que os outros grupos. O consumo médio de água durante o experimento para os ratos CR foi de 15,8 mL/dia, enquanto que o grupo ALC consumiu uma média de 17,41 mL/dia.

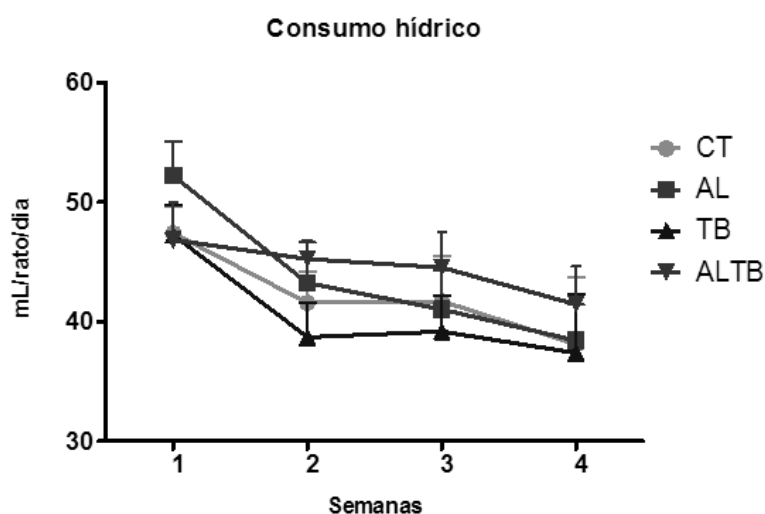


Figura 9. Consumo médio semanal hídrico de ratos tratados com álcool (4g/kg/dia), via oral, expostos à fumaça de 12 cigarros/dia, via inalatória, ou sua associação, por 28 dias. n = 12/grupo; ANOVA-2 vias de medidas repetidas + Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

O alcoolismo e o tabagismo são doenças frequentes e de difícil tratamento. Nesse contexto, o grande desafio da terapia para a drogadição por álcool e cigarro é a descoberta de novos fármacos mais potentes, seletivos e seguros estudar os mecanismos alterados pelo uso de álcool, cigarro ou sua associação, pode auxiliar na construção do conhecimento para desenvolvimento de medicamentos que possam auxiliar na redução da dependência, controle da síndrome de abstinência ou risco de recaída

Visando aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de ação da associação destas drogas que futuramente possam nortear a descoberta de substâncias que possam auxiliar no tratamento da sua dependência, o presente trabalho objetivou a avaliação do efeito da exposição crônica à fumaça do cigarro e ao álcool em associação sobre parâmetros oxidativo, neuroinflamatórios e comportamentais em ratos.

O principal achado desta pesquisa foi, em um primeiro momento, que o abuso de ambas as drogas testadas, ou a sua associação estão relacionadas com estresse oxidativo. O teste de emissão DCFH-DA, mostrou que os resultados são dependentes do tecido avaliado, sendo que alguns apresentaram aumento e outros uma redução da emissão. Em concordância, o teor de GSH, o principal antioxidante do SNC diminuiu no hipocampo, estriado, córtex frontal e soro de ratos que consumiram álcool e cigarro em associação, provavelmente devido ao seu consumo para tentar alcançar o equilíbrio redox. Não devemos desconsiderar também que uma redução de substrato (glutamato), poderia ter reduzido a síntese de GSH.

A hipótese de redução de glutamato também está de acordo com os resultados encontrados para a atividade da enzima GS que foi significativamente menor no hipocampo de animais, para o uso de álcool e cigarro isolados ou em associação. Além disso, sabe-se que a enzima GS é bastante sensível ao estresse oxidativo (Banerjee et al., 2008), que poderia ser mais um fator gerador desta redução.

O uso isolado de álcool e cigarro ou da associação aumentou a concentração de citocinas pró-inflamatórias, avaliadas como $TNF\alpha$ e IL-1. Nossos resultados estão de acordo com outro estudo, que mostra a associação de níveis elevados de

citocinas pró-inflamatórias com estresse oxidativo cerebral e apoptose, por meio da produção de EROS e outros mediadores inflamatórios no cérebro (Kissela et al., 2005).

Também verificamos que o uso isolado de álcool e cigarro ou da associação reduz os níveis de BDNF. Entretanto, apesar dos estudos mostrarem uma relação entre BDNF e a memória, sob nossas condições experimentais, não observamos alteração da memória de curta duração após tratamento crônico com álcool, fumaça de cigarro ou sua associação. Os mecanismos exatos pelos quais a apoptose e a neurogênese interferem na formação de memória e o papel exato para o BDNF nestes dois processos celulares ainda não é totalmente compreendido. Entretanto, de fato, verificamos que a manutenção, crescimento e diferenciação de neurônios e sinapses estão comprometidos com o uso das drogas.

Adicionalmente, nossos resultados mostram que a associação entre álcool e fumaça de cigarro afeta o comportamento alimentar na última semana de exposição. Entretanto, curiosamente, não foi possível observar a alteração do comportamento alimentar pelo uso de álcool isoladamente podendo indicar uma interação entre essas drogas de abuso, potencializando o efeito hipofágico da nicotina, possivelmente modulando sistema serotoninérgico e dopaminérgico no hipocampo. Porém, independentemente das alterações de comportamento alimentar, observamos que os ratos dos grupos CS e ALCS apresentaram menor ganho de peso ao longo do experimento. Acreditamos que o comportamento dos animais do grupo ALCS pode ser justificado pela redução da ingestão de ração, associada ao aumento da taxa metabólica e alteração do trânsito intestinal.

O conjunto de resultados desta investigação em ratos mostrou que álcool e fumaça de cigarro isoladamente ou em associação afetam o SNC e causam, por meio de mecanismos complexos, danos neurológicos pela promoção do estresse oxidativo e da neuroinflamação. Entretanto ressalta-se que a associação entre álcool e cigarro parece potencializar alguns dos efeitos observados apenas pela exposição às drogas individuais, representando maior risco para a saúde. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Nossas conclusões mostram o grande potencial das vias oxidativas e inflamatórias como alvo para novos agentes terapêuticos.

6. CONCLUSÕES

A avaliação de parâmetros neurotróficos, comportamentais, oxidativos e neuroinflamatórios de ratos neste estudo possibilitaram concluir que o uso de álcool em associação com fumaça de cigarro:

- aumenta espécies reativas no hipocampo
- reduz a neuroproteção ao diminuir a concentração de BDNF;
- aumenta a neuroinflamação ao aumentar a concentração de citocinas pró-inflamatórias;
- não afeta a memória de curta duração;
- diminui o comportamento alimentar e o ganho de peso ao longo do experimento, sem afetar a ingesta hídrica.

Portanto, a associação entre álcool e cigarro potencializa mecanismos neurodegenerativos no encéfalo de ratos, representando maior risco para a saúde humana do que seu uso isolado. Estudos adicionais, avaliando outros parâmetros relacionados a morte neuronal, alterações de sistemas neurotransmissores, volume encefálico, entre outros, são necessários para auxiliar na compreensão dos efeitos do uso combinado de álcool e cigarro, duas drogas lícitas, associadas a doença, mortes e prejuízos sociais.

7. REFERÊNCIAS

1. Abreu-Villaça, Y., de Carvalho Graça, A.C., Ribeiro-Carvalho, A., Naiff, V. de F., Manhães, A.C., and Filgueiras, C.C. (2013). Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 15, 1211–1221.
2. Agrawal, R.G., Hewetson, A., George, C.M., Syapin, P.J., and Bergeson, S.E. (2011). Minocycline reduces ethanol drinking. *Brain. Behav. Immun.* 25 *Suppl 1*, S165-169.
3. Alho, H., Sillanaukee, P., Kalela, A., Jaakkola, O., Laine, S., and Nikkari, S.T. (2004). Alcohol misuse increases serum antibodies to oxidized LDL and C-reactive protein. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 39, 312–315.
4. American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. Washington, DC: Author.
5. Aoyama, K., and Nakaki, T. (2015). Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Mol. Basel Switz.* 20, 8742–8758.
6. Arnson, Y., Shoenfeld, Y., and Amital, H. (2010). Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 34, J258-265.
7. Augustyniak, A., Michalak, K., and Skrzydlewska, E. (2005). [The action of oxidative stress induced by ethanol on the central nervous system (CNS)]. *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online* 59, 464–471.
8. Banerjee, R., Vitvitsky, V., and Garg, S.K. (2008). The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission. *Trends Biochem. Sci.* 33, 413–419.
9. Barbieri, S.S., Zacchi, E., Amadio, P., Gianellini, S., Mussoni, L., Weksler, B.B., and Tremoli, E. (2011). Cytokines present in smokers' serum interact with smoke components to enhance endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 90, 475–483.
10. Berry, R.B., and Matthews, D.B. (2004). Acute ethanol administration selectively impairs spatial memory in C57BL/6J mice. *Alcohol Fayettev. N* 32, 9–18.

11. Bizarro, L., Patel, S., and Stolerman, I.P. (2003). Comprehensive deficits in performance of an attentional task produced by co-administering alcohol and nicotine to rats. *Drug Alcohol Depend.* *72*, 287–295.
12. Blednov, Y.A., Ponomarev, I., Geil, C., Bergeson, S., Koob, G.F., and Harris, R.A. (2012). Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies. *Addict. Biol.* *17*, 108–120.
13. Bus, B. a. A., Molendijk, M.L., Penninx, B.J.W.H., Buitelaar, J.K., Kenis, G., Prickaerts, J., Elzinga, B.M., and Voshaar, R.C.O. (2011). Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology* *36*, 228–239.
14. Cano, M., Thimmalappula, R., Fujihara, M., Nagai, N., Sporn, M., Wang, A.L., Neufeld, A.H., Biswal, S., and Handa, J.T. (2010). Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and Age-related Macular Degeneration. *Vision Res.* *50*, 652–664.
15. Cavalcante, T.M., Pinto, M.F.T., Fisch, M. (2003). Brazilian Illegal Cigarette Market: a public health hazard. Poster presentation in 12th World Conference Tobacco or Health Program, Helsinki, Finland.
16. Church, D.F., and Pryor, W.A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* *64*, 111–126.
17. Cobb, C.A., and Cole, M.P. (2015). Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* *84*, 4–21.
18. Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, C., Ciccoli, L., Giardini, A., Vecchio, D., and Arezzini, B. (2010). Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr.* *5*, 101–109.
19. Crews, F.T., and Vetreno, R.P. (2014). Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *Int. Rev. Neurobiol.* *118*, 315–357.
20. Crews, F.T., Bechara, R., Brown, L.A., Guidot, D.M., Mandrekar, P., Oak, S., Qin, L., Szabo, G., Wheeler, M., and Zou, J. (2006). Cytokines and alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *30*, 720–730.

21. Crooks, P.A., and Dwoskin, L.P. (1997). Contribution of CNS nicotine metabolites to the neuropharmacological effects of nicotine and tobacco smoking. *Biochem. Pharmacol.* 54, 743–753.
22. Dahchour, A., De Witte, P., Bolo, N., Nédélec, J.F., Muzet, M., Durbin, P., and Macher, J.P. (1998). Central effects of acamprosate: part 1. Acamprosate blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate in ethanol withdrawn rats. *Psychiatry Res.* 82, 107–114.
23. Das, S.K., and Vasudevan, D.M. (2007). Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* 81, 177–187.
24. Davies, D.L., and Vernadakis, A. (1984). Effects of ethanol on cultured glial cells: proliferation and glutamine synthetase activity. *Brain Res.* 318, 27–35.
25. De Witte, P., Pinto, E., Anseau, M., and Verbanck, P. (2003). Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 189–197.
26. Drougard, A., Fournel, A., Valet, P., and Knauf, C. (2015). Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front. Neurosci.* 9, 56.
27. Dupret, D., Fabre, A., Döbrössy, M.D., Panatier, A., Rodríguez, J.J., Lamarque, S., Lemaire, V., Oliet, S.H.R., Piazza, P.-V., and Abrous, D.N. (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol.* 5, e214.
28. Ebada, M.E., Latif, L.M., Kendall, D.A., Pardon, M.C. (2014). Corticosterone protects against memory impairments and reduced hippocampal BDNF levels induced by a chronic low dose of ethanol in C57BL/6J mice. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* 55, 1303–1316.
29. Falk, D.E., Yi, H., and Hiller-Sturmhöfel, S. (2006). 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 J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* 29, 162–171.
30. Fagerström, K (2006). Uma Breve Apresentação da Neurofarmacologia e Fisiologia da Dependência à Nicotina. In: Gigliotti AP, Presman S (eds). *Atualização no Tratamento do Tabagismo.* ABP Saúde.

31. Fernandez, G.M., Stewart, W.N., Savage, L.M.(2016). Chronic Drinking During Adolescence Predisposes the Adult Rat for Continued Heavy Drinking: Neurotrophin and Behavioral Adaptation after Long-Term, Continuous Ethanol Exposure. *PLoS One* 11, e0149987.
32. Friedman, T.W., Robinson, S.R., and Yelland, G.W. (2011). Impaired perceptual judgment at low blood alcohol concentrations. *Alcohol Fayettev. N* 45, 711–718.
33. G, S.B.A., Choi, S., Krishnan, J., K, R.(2017). Cigarette smoke and related risk factors in neurological disorders: An update. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 85, 79–86. Garcia, L.P., and Freitas, L.R.S. de (2015). Consumo abusivo de álcool no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 24, 227–237.
34. Gilpin, N.W., and Koob, G.F. (2008). Neurobiology of Alcohol Dependence. *Alcohol Res. Health* 31, 185–195.
35. Gomez, R., Schneider, R., Quinteros, D., Santos, C.F., Bandiera, S., Thiesen, F.V., Coitinho, A.S., Fernandes, M. da C., and Wieczorek, M.G. (2015). Effect of Alcohol and Tobacco Smoke on Long-Term Memory and Cell Proliferation in the Hippocampus of Rats. *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 17, 1442–1448.
36. Gonçalves, R.B., Coletta, R.D., Silvério, K.G., Benevides, L., Casati, M.Z., da Silva, J.S., and Nociti, F.H. (2011). Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* 60, 409–424.
37. González-Quintela, A., Dominguez-Santalla, M.J., Pérez, L.F., Vidal, C., Lojo, S., and Barrio, E. (2000). Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. *Cytokine* 12, 1437–1440.
38. González-Reimers, E., Santolaria-Fernández, F., Martín-González, M.C., Fernández-Rodríguez, C.M., and Quintero-Platt, G. (2014). Alcoholism: a systemic proinflammatory condition. *World J. Gastroenterol.* 20, 14660–14671.
39. Gordis, E. (1998). The neurobiology of alcohol abuse and alcoholism: building knowledge, creating hope. *Drug Alcohol Depend.* 51, 9–11.

40. Gulick, D., and Gould, T.J. (2008). Interactive effects of ethanol and nicotine on learning in C57BL/6J mice depend on both dose and duration of treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* 196, 483–495.
41. Haroutunian, V., Barnes, E., and Davis, K.L. (1985). Cholinergic modulation of memory in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 87, 266–271.
42. Howard, L.A., Ahluwalia, J.S., Lin, S.-K., Sellers, E.M., and Tyndale, R.F. (2003). CYP2E1*1D regulatory polymorphism: association with alcohol and nicotine dependence. *Pharmacogenetics* 13, 321–328.
43. INCA (2011). Instituto Nacional de Câncer. Pesquisa especial de tabagismo – PETab: relatório Brasil. Organização Pan-Americana da Saúde; Rio de Janeiro.
44. Izquierdo, I., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Szapiro, G., Coitinho, A.S., Muller, L., Cammarota, M., Bevilaqua, L.R.M., and Medina, J.H. (2002). Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotox. Res.* 4, 573–593.
45. Izquierdo, I. (2011). *Memória*. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed.
46. Jang, E.S., Jeong, S.-H., Hwang, S.H., Kim, H.Y., Ahn, S.Y., Lee, J., Lee, S.H., Park, Y.S., Hwang, J.H., Kim, J.-W., et al. (2012). Effects of coffee, smoking, and alcohol on liver function tests: a comprehensive cross-sectional study. *BMC Gastroenterol.* 12, 145.
47. Kane, C.J., Berry, A., Boop, F.A., and Davies, D.L. (1996). Proliferation of astroglia from the adult human cerebrum is inhibited by ethanol in vitro. *Brain Res.* 731, 39–44.
48. Kapasova, Z., and Szumlinski, K.K. (2008). Strain differences in alcohol-induced neurochemical plasticity: a role for accumbens glutamate in alcohol intake. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 617–631.
49. Kee, N., Teixeira, C.M., Wang, A.H., and Frankland, P.W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 10, 355–362.
50. Kenny, P.J., Paterson, N.E., Boutrel, B., Semenova, S., Harrison, A.A., Gasparini, F., Koob, G.F., Skoubis, P.D., and Markou, A. (2003). Metabotropic glutamate 5 receptor antagonist MPEP decreased nicotine and cocaine self-administration but not nicotine and cocaine-induced facilitation of brain reward function in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003, 415–418.

51. Kirchenchtein, C. and Chatkin, J.M.(2004) Dependência da nicotina. In: Diretrizes para Cessação do Tabagismo. J Br Pneumol.
52. Kissela, B.M., Khoury, J., Kleindorfer, D., Woo, D., Schneider, A., Alwell, K, Miller, R., Ewing, I., Moomaw, C.J., Szaflarski, J.P., Gebel, J., Shukla, R., Broderick, J.P. (2005). Epidemiology of ischemic stroke in patients with diabetes: the Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study. *Diabetes Care*.28:355–359.
53. Lambe, E.K., Picciotto, M.R., and Aghajanian, G.K. (2003). Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 28, 216–225.
54. Lang, U.E., Sander, T., Lohoff, F.W., Hellweg, R., Bajbouj, M., Winterer, G., and Gallinat, J. (2007). Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. *Psychopharmacology (Berl.)* 190, 433–439.
55. Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., and Barde, Y.A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149–152.
56. Little, H.J. (2000). Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* 24, 215–224.
57. Liukkonen, T., Silvennoinen-Kassinen, S., Jokelainen, J., Räsänen, P., Leinonen, M., Meyer-Rochow, V.B., and Timonen, M. (2006). The association between C-reactive protein levels and depression: Results from the northern Finland 1966 birth cohort study. *Biol. Psychiatry* 60, 825–830.
58. Lobo Torres, L.H., Moreira, W.L., Tamborelli Garcia, R.C., Annoni, R., Nicoletti Carvalho, A.L., Teixeira, S.A., Pacheco-Neto, M., Muscará, M.N., Camarini, R., de Melo Loureiro, A.P., Yonamine, M., Mauad, T., Marcourakis, T.(2012).
59. Environmental tobacco smoke induces oxidative stress in distinct brain regions of infant mice. *J. Toxicol. Environ. Health A* 75, 971–980.
60. Logrip, M.L., Janak, P.H., Ron, D.(2009). Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. *J. Neurochem.* 109, 1459–1468.

61. Maes, M. (2013). Inflammatory and oxidative and nitrosative stress cascades as new drug targets in myalgic encephalomyelitis and chronic fatigue syndrome. *Mod. Trends Pharmacopsychiatry* 28, 162–174.
62. MacLennan, A.J., Lee, N., Walker, D.W., 1995. Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 197, 105–108.
63. Meirelles, R.H.S. (2009). Tabagismo e DPOC - dependência e doença - fato consumado. *Pulmão RJ* 1(1), 13-19.
64. McKeon, A., Frye, M.A., and Delanty, N. (2008). The alcohol withdrawal syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 854–862.
65. Moncada, D., and Viola, H. (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 7476–7481.
66. Naik, P., Fofaria, N., Prasad, S., Sajja, R.K., Weksler, B., Couraud, P.-O., Romero, I.A., and Cucullo, L. (2014). Oxidative and pro-inflammatory impact of regular and denicotinized cigarettes on blood brain barrier endothelial cells: is smoking reduced or nicotine-free products really safe? *BMC Neurosci.* 15, 51.
67. Oga S, Ferreira Galvão J, Moraes Moreau RL. *Fundamentos de Toxicologia*. São. Paulo: Ateneu. 2003; p.297-305.
68. Oliveira-da-Silva, A., Vieira, F.B., Cristina-Rodrigues, F., Filgueiras, C.C., Manhães, A.C., and Abreu-Villaça, Y. (2009). Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 27, 539–548.
69. OMS - Organização Mundial da Saúde (2010). Draft Global Strategy to Reduce The Harmful Use Of Alcohol. Acesso em 07/01/2017. http://www.who.int/substance_abuse/activities/gsrhua/en/index.html.
70. OMS - Organização Mundial da Saúde (2012). Global Information System on Alcohol/Tobacco and Health. Acesso em 07/01/2017. <http://www.who.int/research/en/>.

71. OMS - Organização Mundial da Saúde (2014). Global status report on alcohol and health. Acesso em 04/12/2016. http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/.
72. OMS - Organização Mundial da Saúde, 2016. Tobacco - Fact sheet. Acesso em 04/12/2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>.
73. Pandey, S., and Agrawal, D.K. (2006). Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol. Cell Biol.* 84, 333–341.
74. Park, H., and Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23.
75. Petrescu, F., Voican, S.C., and Silosi, I. (2010). Tumor necrosis factor-alpha serum levels in healthy smokers and nonsmokers. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 5, 217–222.
76. Pierce, R.C., and Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 215–238.
77. Pomerleau, C.S., Aubin, H.J., and Pomerleau, O.F. (1997). Self-reported alcohol use patterns in a sample of male and female heavy smokers. *J. Addict. Dis.* 16, 19–24.
78. Portal do Tabaco. Acesso em 19.02.2017 <http://portaldotabaco.com.br/brasil-exporta-mais-de-us-2-bilhoes-em-tabaco-no-ultimo-ano>.
79. Puma, C., Deschaux, O., Molimard, R., and Bizot, J.C. (1999). Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 9, 323–327.
80. Qin, L., He, J., Hanes, R.N., Pluzarev, O., Hong, J.-S., and Crews, F.T. (2008). Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J. Neuroinflammation* 5, 10.
81. Rezvani, A.H., and Levin, E.D. (2002). Nicotine-alcohol interactions and cognitive function in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 865–872.

82. Romberger, D.J., and Grant, K. (2004). Alcohol consumption and smoking status: the role of smoking cessation. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *58*, 77–83.
83. Ron, D., and Messing, R.O. (2013). Signaling pathways mediating alcohol effects. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* *13*, 87–126.
84. Room, R. (2004). Smoking and drinking as complementary behaviours. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *58*, 111–115.
85. Rose, J.E., Brauer, L.H., Behm, F.M., Cramblett, M., Calkins, K., and Lawhon, D. (2004). Psychopharmacological interactions between nicotine and ethanol. *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* *6*, 133–144.
86. Rosemberg, J (2004). *Nicotina Droga Universal*, INCA - Instituto Nacional de Câncer. Monografia. Produção Independente. São Paulo.
87. Rowbottom, D.G., Keast, D., and Morton, A.R. (1996). The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Med. Auckl. NZ* *21*, 80–97.
88. Rueda, A.V.L., Teixeira, A.M.A., Yonamine, M., and Camarini, R. (2012). Environmental enrichment blocks ethanol-induced locomotor sensitization and decreases BDNF levels in the prefrontal cortex in mice. *Addict. Biol.* *17*, 736–745.
89. Sakai, R., Ukai, W., Sohma, H., Hashimoto, E., Yamamoto, M., Ikeda, H., and Saito, T. (2005). Attenuation of brain derived neurotrophic factor (BDNF) by ethanol and cytoprotective effect of exogenous BDNF against ethanol damage in neuronal cells. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* *112*, 1005–1013.
90. Sanday, L., Patti, C.L., Zanin, K.A., Fernandes-Santos, L., Oliveira, L.C., Kameda, S.R., Tufik, S., and Frussa-Filho, R. (2013). Ethanol-induced memory impairment in a discriminative avoidance task is state-dependent. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *37 Suppl 1*, E30-39.
91. Sidique, S., Dhanya, R.-P., Sheffler, D.J., Nickols, H.H., Yang, L., Dahl, R., Mangravita-Novo, A., Smith, L.H., D'Souza, M.S., Semenova, S., et al. (2012). Orally active metabotropic glutamate subtype 2 receptor positive allosteric modulators: structure-activity relationships and assessment in a rat model of nicotine dependence. *J. Med. Chem.* *55*, 9434–9445.

92. SISP - Serviço de informações sobre substâncias Psicoativas. Acesso em 28/01/2017: <http://psicoativas.ufcspa.edu.br/>
93. Tarantino AB (1982). Doenças Pulmonares. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
94. Thoenen, H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270, 593–598.
95. Tsai, G., and Coyle, J.T. (1998). The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu. Rev. Med.* 49, 173–184.
96. Tuon, T., Valvassori, S.S., Lopes-Borges, J., Fries, G.R., Silva, L.A., Kapczinski, F., Quevedo, J., Pinho, R.A., 2010. Effects of moderate exercise on cigarette smoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice. *Neurosci. Lett.* 475, 16–19.
97. Turton, S., and Lingford-Hughes, A. (2016). Neurobiology and principles of addiction and tolerance. *Medicine (Baltimore)* 44, 693–696.
98. Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., and Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65–74.
99. Vasconcelos, S.M.M., Sales, G.T.M., Lima, N.M., Soares, P.M., Pereira, E.C., Fonteles, M.M.F., Sousa, F.C.F. de, and Viana, G.S. de B. (2008). Determination of amino acid levels in the rat striatum, after administration of ethanol alone and associated with ketamine, a glutamatergic antagonist. *Neurosci. Lett.* 444, 48–51.
100. World Bank. (2003). Tobacco and Health in the Developing World. A Background Paper for the High Level Round Table On Tobacco Control and Development Policy. Organized by the European Commission in collaboration with the World Health Organization and the World Bank, Brussels, February.
101. White, F.J. (2002). A behavioral/systems approach to the neuroscience of drug addiction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 3303–3305.
102. Xiao, L., Kish, V.L., Benders, K.M., Wu, Z.-X. (2015). Prenatal and Early Postnatal Exposure to Cigarette Smoke Decreases BDNF/TrkB Signaling and Increases Abnormal Behaviors Later in Life. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19.

103. Zhang, X.Y., Xiu, M.H., Chen, D.C., Yang, F.D., Wu, G.Y., Lu, L., Kosten, T.A., and Kosten, T.R. (2010). Nicotine dependence and serum BDNF levels in in male patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 212(3):301-307.

104. Zhao, N., Zhong, C., Wang, Y., Zhao, Y., Gong, N., Zhou, G., Xu, T., and Hong, Z. (2008). Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. *Neurobiol. Dis.* 29, 176–185.

ANEXO A



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 30088

Título: EFEITO DA ASSOCIACAO DE ALCOOL E CIGARRO SOBRE SISTEMAS NEUROTRANSMISSORES E MEMORIA DE RATOS

Vigência: 05/12/2015 à 04/12/2017

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ROSANE GOMEZ - coordenador desde 05/12/2015
ANDRE QUINCOZES DOS SANTOS - pesquisador desde 05/12/2015
DAYANE ALVES QUINTEROS - Aluno de Mestrado desde 05/12/2015
Ricardo Schneider Junior - Aluno de Doutorado desde 05/12/2015
RIANNE REMUS PULCINELLI - Aluno de Especialização desde 05/12/2015
Alana Witt Hansen - Aluno de Doutorado desde 05/12/2015
Solange Bandiera - Aluno de Doutorado desde 05/12/2015

Equipe Externa:

Greice Caletti - pesquisador desde 05/12/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 25/01/2016 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro- em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 96 ratos machos Wistar, adultos, provenientes de CREAL- UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 3 de Março de 2016

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética