

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Efeito da associação entre álcool e cigarro sobre a proliferação celular
hipocampal e memória em ratos

Aluna

Marina Gonçalves Godinho Wiczorek

Orientadora

Profa. Dra .Rosane Gomez

Colaboradora

Profa. Marilda C. Fernandes, UFCSPA

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Mestrado e Doutorado

Page: www.ufrgs.br/ppgfsio

Rua Sarmiento Leite, número 500, 2º andar
90050-170 – Porto Alegre – RS - Brasil

**Efeito da associação entre álcool e cigarro sobre a proliferação
celular hipocampal e memória em ratos**

MARINA GONÇALVES GODINHO WIECZOREK

Orientadora: Dra. Rosane Gomez

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Fevereiro de 2013

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araújo
Departamento de Fisiologia
ICBS - UFRGS

Profa. Dra. Maria Beatriz Ferreira
Departamento de Farmacologia
ICBS - UFRGS

Profa. Dra. Lisiane Bizarro Araujo
Departamento de Psicologia do Desenvolvimento e da Personalidade
Instituto de Psicologia - UFRGS

Dedico esse trabalho a minha família

Agradecimentos

A minha orientadora, Profa. Dra. Rosane Gomez, pela sua competência na participação de todos os processos da minha formação no presente mestrado, agindo de maneira singular às correções e sugestões das quais fizeram com que este trabalho fosse concluído com êxito.

À Profa. Dra. Marilda C. Fernandes, por sua ajuda ao ceder o Laboratório de Patologia da UFCSPA e disponibilizar pessoas aptas para o meu treinamento na técnica de imunoistoquímica, e também por suas sábias e criteriosas avaliações das lâminas.

Aos meus familiares, que sempre me deram amor, força e que tiveram muita, mas muita compreensão mesmo. Isso se refere principalmente ao meu marido e ao meu filho amado.

A todos os colaboradores e bolsistas do laboratório de Álcool e Tabaco, pela ajuda, em especial na etapa dos experimentos.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos os meus amigos e amigas, que sempre estiveram presentes, me aconselhando e incentivando, e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado.

Sumário

Lista de Figuras e Tabelas.....	8
Resumo	9
<i>Abstract</i>	11
1. Introdução	13
1.1 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação	14
1.2 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre a memória	16
1.3 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre a proliferação celular hipocampal	18
1.4 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre variações de peso corporal, consumos alimentar e hídrico.....	19
1.5 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre parâmetros bioquímicos	21
2. Justificativa	24
3. Objetivos	
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
4. Materiais e métodos	
4.1 Animais	28
4.2 Soluções e exposição à fumaça do cigarro	28
4.3 Procedimentos experimentais	29
4.4 Avaliação da memória de trabalho: teste de reconhecimento espontâneo de objetos	31
4.5 Avaliação da memória de longa duração: esquiva inibitória	32
4.6 Proliferação celular: Imunoistoquímica do BrdU.....	33

4.7 Análises bioquímicas e alcoolemia.....	34
4.8 Análise estatística	34
5. Resultados	
5.1 Proliferação celular.....	34
5.2 Memória de trabalho e memória de longa duração.....	36
5.3 Concentração de monóxido de carbono na câmara de exposição e alcoolemia	38
5.4 Peso corporal, consumos alimentar e hídrico.....	39
5.5 Parâmetros bioquímicos	41
6. Discussão	
6.1 Proliferação celular	43
6.2 Memória de trabalho e memória de longa duração.....	45
6.3 Concentração de monóxido de carbono na câmara de exposição ealcoolemia	48
6.4 Variações de peso, consumos alimentar e hídrico.....	49
6.5 Parâmetros bioquímicos	51
7. Conclusões.....	53
8. Referências	55
9. Anexo I: Aprovação do Comitê de Ética.....	68

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1.	Aparato utilizado para o teste de reconhecimento espontâneo de objetos, para avaliação de memória de curto prazo, em ratos.....	31
Figura 2.	Aparelho da Esquiva Inibitória, conectado à fonte elétrica (0,4 mA, 2 s) para avaliação da memória de longa duração (24 horas), em ratos.....	32
Figura 3.	Fotos e gráfico. Efeito da exposição crônica ao álcool (ALC) (B), fumaça de cigarro (TAB) (C) ou sua associação (ALCTAB) (D) sobre a proliferação celular hipocampal de ratos. n = 10/grupo; ANOVA-1 via + Bonferroni; resultados expressos como média ± erro padrão. * diferente do controle (CTR) (A) $P < 0,05$	35
Figura 4.	Efeito da exposição crônica ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB) sobre a memória de trabalho de ratos, avaliada no teste de reconhecimento espontâneo de objetos. A: índice de memória; B: exploração dos objetos no momento do treino. n = 10/grupo; ANOVA-1 via; resultados expressos como média ± erro padrão.....	36
Figura 5.	Efeito da exposição crônica ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB) sobre a memória de longa duração em ratos, avaliada no teste de esquiva inibitória. n = 10/grupo; ANOVA-1 via; resultados expressos como média ± erro padrão.	37
Figura 6.	Concentração de monóxido de carbono na câmara de exposição à fumaça do cigarro em diferentes tempos. A: durante ou B: após o intervalo da queima dos cigarros.....	38
Figura 7.	Efeito da exposição crônica ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB) sobre o ganho de peso corporal semanal em ratos. n = 10/grupo; ANOVA-1 via de medidas repetidas + Bonferroni; resultados expressos como média ± erro padrão; * diferentes de CTR e TAB, $P = 0,032$	39
Figura 8.	Consumo diário de ração por ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB), ao longo de 4 semanas. n = 10/grupo; ANOVA-1 via de medidas repetidas + Bonferroni; resultados expressos como média ± erro padrão; * diferentes de ALC, $P = 0,012$	40
Figura 9.	Consumo diário de água por ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB) ao longo de 4 semanas. n = 10/grupo; ANOVA-1 via de medidas repetidas + Bonferroni; resultados expressos como média ± erro padrão; * diferentes de CTR e TAB, $P < 0,001$; ** diferente de CTR, ALC e TAB, $P < 0,001$	41
Tabela 1	Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou associação entre essas duas drogas de abuso (ALTAB) sobre alguns parâmetros bioquímicos no plasma de ratos. ANOVA-1 via + Bonferroni; média ± desvio padrão	42
Tabela 2	Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou associação entre essas duas drogas de abuso (ALTAB) sobre parâmetros bioquímicos no plasma de ratos. ANOVA-1 via + Bonferroni; média ± desvio padrão.....	42

Resumo

Mais de 90% dos indivíduos alcoolistas são fumantes e fumantes consomem duas vezes mais álcool que não fumantes. Uma justificativa para a elevada frequência do uso concomitante dessas duas drogas de abuso seria reduzir os efeitos indesejáveis e prolongar os efeitos prazerosos de ambos. Embora muitos estudos avaliem o efeito isolado dessas duas drogas sobre funções do sistema nervoso central, poucos avaliam o efeito da associação. Portanto, foi nosso objetivo avaliar o efeito da associação entre álcool e cigarro sobre a proliferação celular hipocampal e a memória, em ratos adultos. Ratos Wistar, machos, adultos (280 a 300g) foram divididos em grupos (n = 10/grupo): a) TAB: expostos diariamente à fumaça da queima de 6 cigarros, por 2 h, em câmara hermética com circulação de ar controlada; b) ALC: administrados com etanol, 2g/kg (20% w/v), via gavagem (VO), mantidos por 2 h em câmara com circulação de ar ambiental; c) ALCTAB: administrados com etanol (2g/kg), VO, e imediatamente após expostos à fumaça de 6 cigarros e d) CTR: administrados com salina, VO, mantidos por 2 h em câmara com circulação de ar ambiental. O tratamento se repetiu 2 vezes ao dia (9 e 14h), por 33 dias. No 25º dia do início do experimento foram avaliados para memória de trabalho no teste de reconhecimento espontâneo de objetos e no 28º (treino) e 29º (teste) para memória de longa duração no teste da esQUIVA inibitória. No 34º dia do início do experimento os ratos foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) após duas administrações de 100 mg/kg de *5-bromo-2-deoxyuridine*, via intraperitoneal, 24 e 2 h antes da eutanásia. Após perfusão transcardíaca para fixação do encéfalo os cérebros foram removidos para posterior inclusão em parafina. Células imunorreativas foram quantificadas na camada granular e zona subgranular do giro denteado do hipocampo dos ratos. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Bonferroni para detecção de diferença entre os grupos ($P \leq 0,05$). O

sangue troncular de alguns ratos foi coletado para determinação de parâmetros bioquímicos. Nossos resultados mostraram que álcool, cigarro ou sua associação não afetaram a memória de trabalho ou a memória de longa duração. No entanto, a associação ALCTAB reduziu em cerca de 60% a proliferação celular hipocampal. Adicionalmente, observamos que o uso de álcool, isoladamente, reduziu a proliferação hipocampal em 40% e a exposição ao cigarro, em 20%. O consumo hídrico aumentou de modo significativo para o grupo ALCTAB, do mesmo modo que a glicemia. Portanto, nossos resultados indicam que a associação entre álcool e tabaco afeta negativamente a proliferação celular hipocampal de ratos. A redução observada nos animais ALCTAB resulta da soma dos efeitos observados nos grupos ALC e TAB isoladamente, sugerindo um efeito aditivo. Todavia, não observamos efeitos na memória de trabalho ou na de longo prazo, possivelmente relacionados à exposição de doses moderadas de álcool ou exposição à fumaça de pouco cigarros ao dia. Não descartamos, contudo, que um tempo maior de exposição possa afetar esses parâmetros.

Abstract

More than 90% of alcoholics are smokers and smokers drink twice than nonsmokers. One possible reason for the high frequency of concomitant use of these two drugs of abuse could be related to decreasing on undesirable effects and prolong the pleasurable effects of both. Although there are many studies evaluating the effect of these two drugs in the central nervous system, few studies evaluate the effect of the combination between alcohol and tobacco. Therefore, our objective was to evaluate the effect of the association between alcohol and cigarette smoking on hippocampal cell proliferation and memory in adult rats. Male Wistar rats, adult (280 to 300g) were divided into groups (n = 10/group): a) TAB: daily exposed to the smoke from burning of 6cigarettes for 2 h in hermetic chamber with controlled air circulation; b) ALC: administrated with ethanol 2g/kg (20% w / v), by gavage (PO), kept for 2 h in a chamber with air circulation environmental c) ALCTAB: administrated with ethanol (2g/kg) PO, and immediately after exposure to 6cigarette smoke and d) CTR: administered with glucose solution (5%0 , PO, kept for 2 h in a chamber with air circulation environment. The treatment was repeated twice a day (9 a.m. and 2 p.m.) for 33 days. On the 25th day of the beginning of the experiment rats were assessed for working memory the in the novel spontaneous objects recognition task and 28th (training) and 29th(test) to long-term memory in inhibitory avoidance test. After 34 days from the beginning of the experiment, rats were anesthetized with ketamine (50 mg / kg) and xylazine (10 mg / kg) after two administrations of 100 mg/kg of 5-bromo-2-deoxyuridine, intraperitoneally, 2 h before the euthanasia. After transcardiac perfusion the brain were fixed and included in paraffin. Immunoreactive cells were quantified in the granular layer and subgranular zone of the dentate gyrus(GD) of the hippocampus of rats. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA)-one way followed by the Bonferroni test for detecting difference between groups (P <0.05).

Biochemical parameters were analyzed from the trunk blood of some rats. Our results showed that alcohol, cigarettes or their association did not affect working memory or long term memory. However, the association ALCTAB reduced the hippocampal cell proliferation by about 60%. Additionally, we observed that the use of alcohol alone reduced hippocampal proliferation by 40% and exposure to smoking in 20%. The water consumption increased significantly in the group ALCTAB in the same way that blood glucose levels. Therefore, our results indicate that the association between alcohol and tobacco negatively affects hippocampal cell proliferation in rats. Decreasing on cell proliferation in the ALCTAB group can be taken as the sum from ALC and TAB groups, suggesting an additive effect. However, we observed no effects on working memory or long-term memory, possibly related to exposure to moderate doses of alcohol or few cigarettes smokes along the day. We do not discard that longer exposition would affect these parameters.

1. Introdução

Álcool e cigarro são drogas lícitas amplamente consumidas pela população em geral, comumente utilizadas em associação (OMS 2010). De acordo com a literatura, 2/3 da população brasileira adulta consome bebidas alcoólicas, sendo que 30% destas também possuem o hábito de fumar (Galdurózet al., 2005; Laranjeira, 2007). Curiosamente, estudos mostram que mais de 90% dos indivíduos alcoolistas são fumantes e que os fumantes consomem duas vezes mais álcool do que os indivíduos que não fumam (DiFranza e Guerrero et al., 1990; Falk et al., 2006). Além disso, fumantes têm maior risco de dependência ao álcool do que não fumantes (John et al., 2003).

O consumo destas duas drogas é frequentemente estimulado em anúncios comerciais, filmes, letras de música e outros meios de comunicação (Gigliotti e Bessa, 2004). A apresentação explícita ou implícita do álcool e do cigarro pela mídia, associados a fatores desejáveis como prazer, beleza, sucesso financeiro e sexual, poder, dentre outros, configura-se como um importante fator estimulador para o uso dessas drogas (Jessor, 1993; Zaslów e Takanishi, 1993).

Contudo, existem questões ambíguas em relação ao consumo dessas substâncias: se, por um lado, são produtos de grande comercialização, cujo consumo é estimulado pela mídia, por outro lado, seu abuso pode originar graves transtornos de saúde, além de eventos associados, como criminalidade, violência noturna e acidentes de trabalho, fazendo com que muitos países adotem medidas políticas para redução e restrição do seu consumo (Ministério da Saúde, 2003; Mandel et al., 1992; OMS; 2010).

Uma vez que o consumo de álcool e cigarro promove prejuízo à saúde, então porque ainda são drogas de uso legal? Uma possível resposta seria que há grande movimentação financeira na venda destas duas substâncias, além do que, para o caso do álcool, seu uso acompanha a humanidade desde seus primórdios, ocupando um lugar

privilegiado em todas as culturas, como elemento fundamental nos rituais religiosos, ou ainda presente nos momentos de comemoração e de confraternização, fazendo com que frequentemente esteja presente no cotidiano da população em geral (Gigliotti e Bessa, 2004).

Embora o estímulo para seu consumo e o fato de serem drogas legais possam justificar o elevado número de usuários, ainda não se sabe ao certo porque são frequentemente utilizadas em associação. Alguns pesquisadores sugerem que, por serem drogas lícitas, sua venda livre aumenta o risco de abuso e dependência por indivíduos impulsivos, compulsivos ou aqueles geneticamente predispostos à dependência (Little, 2000; Falk et al., 2006). Outros sugerem o envolvimento de mecanismos farmacológicos, pois álcool e nicotina, a substância psicoativa presente no cigarro, se contrapõem em alguns de seus efeitos. Enquanto a nicotina aumenta o estado de alerta, o álcool promove perda do controle motor e aumento do tempo de reação (Rose et al., 2004; Room, 2004). Portanto, o uso associado reduziria sinais de intoxicação, prolongando os efeitos prazerosos. Também, nessa linha de pensamento, a associação seria justificada pela redução dos sinais de abstinência por uma ou outra droga, pois álcool e nicotina apresentam efeito ansiolítico em comum (Room, 2004; Little, 2000; Falk et al., 2006). Além disso, não se descarta que o uso concomitante apresente efeito sinérgico, não só prolongando o prazer, como também o intensificando (Rose et al., 2004; Little, 2000).

1.1 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação

Etanol ou álcool etílico, cuja fórmula química é $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, é o álcool mais comum, presente nas bebidas alcoólicas (Ogaet et al., 2003). Quando ingerido em pequenas quantidades, o álcool pode ocasionar sensação de bem-estar, alegria, excitação e desinibição. Em quantidades maiores, aparecem efeitos como irritabilidade, sonolência,

tontura, ataxia, que podem ficar mais graves, com perda de consciência, hipoglicemia, anestesia, coma profundo e morte por depressão respiratória (Gigliotti e Bessa, 2004). Náuseas, vômitos, tonturas e fogacho também são comuns pelo consumo do álcool (Ogaet al., 2003; Gigliotti e Bessa, 2004). Além disso, doses elevadas de álcool comprometem o desempenho cognitivo, dificultando a execução das tarefas que avaliam memória de trabalho e memória de longa duração (Koelega, 1995). Seus efeitos sobre a saúde, quando utilizado em longo prazo, dependem da dose utilizada. O uso crônico em baixas doses apresenta efeito cardioprotetor, enquanto doses maiores estão associadas ao aparecimento de úlcera péptica, cirrose, câncer e outras doenças (Cahill e Redmond, 2012; Sinforianiet al., 2011; Seth et al., 2011).

O 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, 2012). Dentre os componentes gasosos da fumaça estão o monóxido e o 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, 2012). Entre as principais doenças causadas pelo uso do cigarro, destacam-se câncer de pulmão, bronquite crônica, enfisemapulmonar, coronariopatias, cânceres de língua, faringe, esôfago e bexiga (OMS, 2010). Também está comprovado que o fumo durante a gravidez está relacionado com maior 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 (Crooks e Dwoskin, 1997). Ela também reduz a irritabilidade e a agressividade (Crooks e Dwoskin, 1997).

Como anteriormente mencionado, 50 a 80% dos 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. Animais que receberam nicotina aumentaram a auto administração de álcool (York e Hirsch, 1995). Também há estudos que 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 *per se* bastante grande, quando utilizada cronicamente e em grandes concentrações (OMS, 2012). Os efeitos sobre o sistema nervoso central (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; Gulicke Gould, 2008; Sanday et al., 2013). Curiosamente, embora haja uma alta frequência de uso em associação, 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.

1.2 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre a memória

Memória é definida como a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações (Izquierdo, 2002). A aquisição representa a aprendizagem, enquanto a formação e a conservação representam processos complexos, dependentes do tipo de memória. A evocação, por outro lado, é a recordação, a lembrança daquilo que foi aprendido anteriormente (Squire, 2004).

Com relação aos tipos de memórias, elas podem ser classificadas de acordo com o tempo. No presente estudo, avaliamos memória de trabalho e memória de longa duração. A memória de trabalho é a memória imediata (Izquierdo 2002). Nesses casos, no momento em que a informação é recebida, o cérebro determina se esta é uma informação nova ou não, se é útil para o organismo ou não. Ela serve para manter a informação por alguns segundos ou poucos minutos e não produz arquivos(Izquierdo, 2002; Dash et al.,2007).

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, 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, 2002;Moncada e Viola, 2007).

Com relação ao álcool,estudos mostram que há uma relação entre processo neurodegenerativos e o consumo dessa droga. Pensa-se que isto pode ser o resultado do efeito direto do álcool sobre os tecidos ou do seu efeito indireto por meio da presença de metabólitos tóxicos, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio, bem como redução das defesas antioxidantes (Neiman, 1998; Das e Vasudervan., 2007).Já se sabe que os neurônios, principalmente os presentes no giro denteado do hipocampo, são especialmente vulneráveis aos efeitos nocivos das espécies reativas, pois possuem altas taxas metabólicas, baixas concentrações de antioxidantes e capacidade reduzida de regeneração, estando associados a risco aumentado de neurodegeneração e consequente comprometimento de algumas funções cerebrais(Reynolds et al., 2007).

Este mesmo raciocínio é aplicável aos produtos inalados após a queima da folha de tabaco. A fumaça do cigarro contém substâncias também produtoras de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, afetando funções celulares como aquelas dos ribossomos ou das

mitocôndrias, promovendo estresse oxidativo e neurodegeneração (Ramachandran et al., 2007).

Estudos avaliando o efeito do álcool em seres humanos mostram que ele interfere negativamente sobre o desempenho cognitivo em inúmeros testes, especialmente naqueles que exigem manutenção da atenção (Hoffmann e Matthews, 2001; Leitz et al., 2009; Sauls et al., 2007), enquanto o cigarro ou a nicotina aumentam o controle motor fino, o estado de alerta e a memória de trabalho (Heishman et al., 2010; Kleykamp et al., 2011). No entanto, quando avaliados em associação, o cigarro não melhora o desempenho em testes de memória de trabalho verbal, em fumantes crônicos que ingeriram o equivalente a 0,8 g/kg de álcool, nem tão pouco o álcool, nessa dose, isoladamente, afeta a memória de trabalho (Greenstein et al., 2010). Em animais, os resultados também são controversos. 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 et al., 2002). Um único estudo, que avalia a associação entre álcool e fumaça do cigarro, mostra que a memória, ao contrário do esperado, foi afetada negativamente nos grupos de camundongos adolescentes expostos à fumaça do cigarro, não sendo modificada pela coadministração de álcool (Abreu-Villaça et al., 2012).

1.3 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre a proliferação celular hipocampal

Embora não se possa fazer uma correlação direta entre déficit de memória e proliferação celular hipocampal, alguns autores mostram que o uso de álcool e nicotina reduz a neurogênese hipocampal, associado ao déficit de memória e aprendizado em roedores (Shorset et al., 2012; Janget et al., 2002; Abreu-Villaça et al., 2007). Quando

administrados isoladamente, tanto álcool quanto nicotina reduzem a taxa de proliferação neuronal em roedores (Scerri et al., 2006; Nixon e Crews, 2002). No entanto, não há estudos avaliando o efeito da associação entre álcool e cigarro sobre a proliferação celular hipocampal. De fato, estudos investigando o efeito da coadministração em roedores são desenhados comparando-se grupos tratados com diferentes doses de álcool, por via intraperitoneal, ou oferecidos na dieta, e grupos tratados com diferentes doses de nicotina, administrada por via intraperitoneal, subcutânea ou infusão contínua (Matta et al., 2007). Nesses estudos, a via de administração e as elevadas doses são diferentes daquelas utilizadas por seres humanos, dificultando a inferência dos resultados obtidos em animais. Além disso, componentes presentes na fumaça do cigarro também podem interferir sobre fatores farmacocinéticos, modificando a biodisponibilidade tanto do álcool quanto da nicotina (Horowitz et al., 1991; Chen et al., 2001).

Contudo, não há estudos avaliando o impacto da associação do álcool e da fumaça do cigarro sobre proliferação celular hipocampal, tendo em vista que a fumaça do cigarro agrega, além da nicotina, outras substâncias que podem ser neurotóxicas.

1.4 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre variações de peso corporal, consumos alimentar e hídrico

Os efeitos nocivos do álcool e do ato de fumar cigarro sobre diferentes órgãos do corpo humano já são bem conhecidos. Porém, poucos estudos avaliam os efeitos da associação entre álcool e cigarro sobre parâmetros metabólicos, como variações de peso corporal e ingestão de água e de comida.

Estudos avaliando o efeito do álcool sobre variações de peso corporal são controversos. Embora o álcool apresente valor energético, estudos mostram que o consumo de álcool está associado à redução do peso corporal em roedores. Pereira e

colaboradores(2012) observaram que a administração de álcool, na concentração de 30%, na água de beber, por 6 meses, reduz o peso de ratos e leva a sinais de desnutrição. Estes e outros autores sugerem que o estado de desnutrição dos animais tratados cronicamente com álcool se deve a lesões de mucosa gástrica, uma vez que o álcool é sabidamente lesivo sobre essa mucosa, produzindo úlceras e dificultando processos de cicatrização (Bronchalet al., 2008). Isto poderia explicar, em parte, porque indivíduos alcoolistas não são necessariamente obesos. Outros sugerem que, embora contribua em termos calóricos, ele representa uma “caloria vazia”, uma vez que os processos envolvidos no metabolismo do álcool dispendem energia (Levine et al., 2000; Lieber, 1991). De fato, os processos envolvidos pelo metabolismo do álcool, no sistema microssomal hepático, consomem mais de 1/3 do conteúdo calórico do próprio álcool, comprometendo a síntese de ATP por grama de álcool oxidado (Lands e Zakhari, 1991).

Para a ingestão hídrica, vários estudos mostram que o álcool afeta o sistema hidroeletrólítico, principalmente por sua interferência sobre o sistema nervoso autônomo simpático (Akker, 1991; Chan et al., 1985). O aumento das catecolaminas e do cortisol pela ativação do simpático deflagra a cascata de reações do sistema renina – angiotensina – aldosterona, promovendo retenção de sódio e água, aumentando a excreção de potássio (Patterson-Buckendahl et al., 2005; Tomson e Lip, 2005). Quando a concentração de aldosterona permanece elevada por longo tempo, essa retenção de sódio e água provoca um aumento do volume extracelular de 10 a 15%, resultando em edema e elevação da pressão arterial, comum em alcoolistas crônicos (Tomson e Lip, 2005). Outro fator que pode estar associado ao aumento da ingestão hídrica a curto prazo é o efeito do álcool sobre o hormônio antidiurético (ADH), inibindo-o (Guyton e Hall, 2001). Esse efeito está associado à desidratação e à ativação do centro da sede no hipotálamo, levando a aumento da ingestão hídrica. Estudo recente, conduzido em animais, comprovou o envolvimento da

aldosterona no aumento da pressão arterial. Porém, ao contrário do esperado, observaram redução da ingestão hídrica dos ratos (Barreroet al., 2012). Tal resultado foi justificado pelos autores pelo fato de o álcool ter sido administrado na água de beber, tornando-a pouco palatável e inibindo esse comportamento (Barreroet al., 2012).

Para o cigarro, variações de peso corporal já são mais estudadas, indicando que a nicotina e os constituintes do cigarro promovem perda de peso. A ativação de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos pela nicotina, no centro da fome, no hipotálamo, parece contribuir para esse efeito em camundongos (Chen et al., 2005). Além disso, estudos em seres humanos mostram que fumar aumenta a atividade adrenérgica, promovendo termogênese (PisingereJorgensen, 2007). Outro fator que pode contribuir para redução de peso em usuários de tabaco é o retardo do esvaziamento gástrico, associado aos efeitos da nicotina sobre a motilidade intestinal, aumentando a sensação de saciedade e promovendo a liberação de peptídeos intestinais sabidamente anorexígenos, como o peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) (Gritzel al., 1988). Afora isso, a nicotina também atua diretamente sobre o metabolismo do tecido adiposo, promovendo oxidação lipídica, associada a redução do índice de massa corporal (IMC) em seres humanos (Ferrara et al., 2001).

Não há, no entanto, estudos avaliando os efeitos da associação do álcool e do cigarro sobre variações de peso corporal, ingestão hídrica ou alimentar, em usuários.

1.5 Efeitos do álcool, cigarro e sua associação sobre parâmetros bioquímicos

Também são conhecidos os efeitos do álcool e do cigarro sobre parâmetros metabólicos e bioquímicos e sua relação com risco de doenças metabólicas entre usuários (Balhara, 2012, Alkerwiet al., 2009).

Embora se tenha ideia de que a hipoglicemia é comum em pacientes alcoolistas, estudos mostram que ela ocorre apenas em pacientes severamente intoxicados (SucoveWoolard, 1995). Mais comum é se observar aumento da glicemia pelo consumo de álcool (Hoffman eGoldfrank, 1989).Estudos em indivíduos saudáveis revelam que mesmo em doses moderadas, o álcool aumenta a glicemia pós-prandial, possivelmente associada à redução da sensibilidade à insulina (Hätönen et al., 2012).Em animais, o consumo moderado de álcool por ratos diabéticos tratados com 2 g/kg, três vezes por semana, por três semanas, não mostrou alteração significativa nos níveis glicêmicos, nem na hemoglobina glicada(Adaramoye e Oloyede, 2012).

Fumar cigarro, do mesmo modo, tem sido associado com redução da sensibilidade e desenvolvimento de resistência à insulina, mesmo após uso agudo (Fratiet al., 1996). Além disso, fumar aumenta os níveis sanguíneos de cortisol, catecolaminas e hormônio do crescimento, que, sabidamente, apresentam ação antagonista da insulina (Attvallet al., 1993). Associado a esses efeitos, o aumento dos ácidos graxos circulantes em tabagistas acentua ainda mais o aumento da resistência à insulina e de frequência cardíaca, evidenciando o risco de síndrome metabólica entre usuários (Palatini et al., 1997). Embora esses achados levem à suposição de que a associação entre álcool e tabaco possa ter um efeito sinérgico sobre a glicemia, um estudo avaliando essa associação em seres humanos não mostrou evidência de aumento de risco para desenvolvimento de síndrome metabólica (Santos et al., 2007). No entanto, mais estudos são necessários para relacionar o padrão de consumo e aumento de glicemia entre usuários de álcool e de cigarro.

Além da glicemia, quando se considera síndrome metabólica, outros parâmetros são também considerados marcadores de risco. Dentre eles, estão triglicerídeos e lipoproteínas plasmáticas. Para o álcool, são bem conhecidos os efeitos benéficos associados ao uso crônico de doses moderadas na prevenção de doenças coronarianas e

acidente vascular cerebral isquêmico, associado a alterações na concentração sérica de lipoproteínas (Brinton, 2010; Dancygier et al., 2010). No entanto, estudos em coelhos mostram que doses de 30 mL/kg/dia aumentam, além do HDL, também o colesterol total, LDL e triglicerídeos, após 4 semanas de tratamento (Ikemura et al., 1992). Também ratos diabéticos tratados com álcool apresentam aumento de triglicerídeos, colesterol e LDL (Adaramoye e Oloyede., 2012).

Estudos conduzidos em fumantes mostram redução da concentração plasmática de HDL, entre fumantes ativos e fumantes passivos (Glueck et al., 1981; Moffat et al., 1995; Whig et al., 1992). Outros estudos mostram que, além de reduzir o HDL, fumar está associado ao aumento da concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol LDL (Glueck et al., 1981; Croft et al., 1987). Em ratos, no entanto, a exposição à fumaça do cigarro não alterou a concentração plasmática de triglicerídeos, HDL, LDL ou colesterol total (RahimeNaveed, 2011). A associação entre álcool e cigarro parece não afetar de modo significativo a concentração plasmática dessas lipoproteínas, embora os níveis de triglicerídeos permaneçam elevados (Glueck et al., 1981).

Considerando ainda alterações bioquímicas pelo álcool e tabaco, vale lembrar que fígado e rins são os principais responsáveis pelo metabolismo e excreção de todos os constituintes dessas drogas de abuso, tornando-os vulneráveis a danos pelo uso/abuso (Bunout, 1999; Thurman et al., 1999). Alguns parâmetros são marcadores de dano nesses tecidos, como a enzima alanina amino-transferase (ALT), encontrada principalmente no citoplasma, ou como a enzima aspartato amino-transferase (AST), encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias dos hepatócitos (Satyapalet al., 2008). A elevação das concentrações séricas destas duas enzimas, resultado da ruptura da membrana plasmática do hepatócito, é indicativa de dano (Limdi e Hyde, 2003). Outra enzima marcadora de dano hepático é a gama-glutamilttransferase (GGT), encontrada em hepatócitos e células

epiteliais biliares. Apesar de ser um teste sensível, a utilidade da GGT é limitada pela falta de especificidade, pois níveis elevados podem ser observados não só no alcoolismo crônico, mas também em infarto agudo do miocárdio, insuficiência renal, doença pulmonar obstrutiva crônica e diabetes (Goldberg e Martin, 1975). Quando analisadas no seu conjunto, alterações das concentrações dessas enzimas indicam dano hepático. Usualmente, os níveis de AST e ALT estão abaixo de 300 U/L quando do dano hepático pelo álcool, sendo que a ALT pode inclusive estar com os níveis normais, mesmo perante severo dano causado pelo uso abusivo desta droga (Cohen e Kaplan, 1979).

Com relação à função renal, estudos sugerem que o álcool não apresenta efeito danoso sobre o rim, embora o uso crônico esteja associado a outras complicações, como, por exemplo, aumento da pressão arterial e alterações de ureia e creatinina (Majumdar et al., 1982). Entretanto os resultados de testes bioquímicos para detectar disfunção renal pelo uso de álcool são controversos. Enquanto, em ratos, o tratamento por 12 semanas com 1,6 g/kg de álcool aumenta a concentração de ureia e creatinina (Das et al., 2008), em seres humanos, o consumo de álcool está associado à redução da concentração de ureia e creatinina (Chan-Yeung et al., 1981). O tabagismo, por outro lado, também está associado à disfunção renal, relacionada com tempo de uso e número de cigarros fumados por dia (Tylicki et al., 2006). No entanto, não há estudos avaliando o efeito da associação álcool e tabaco sobre a função renal.

2. Justificativa

Apesar de diversos estudos mostrarem os efeitos deletérios do álcool e do cigarro em diferentes tecidos, quando utilizados de modo isolado, a literatura é escassa no que se refere ao uso concomitante dessas duas drogas de abuso, apesar da elevada frequência de uso em associação.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012), o uso abusivo de álcool é responsável por mais de 2,5 milhões de mortes anualmente, estando ele associado a aumento de risco de mais de 60 diferentes tipos de doenças. Ainda mais alarmantes são os dados obtidos para o cigarro. Cerca de 6 milhões de pessoas morrem por ano em consequência do uso crônico dessa droga, projetando-se uma morte a cada 6 segundos (OMS, 2012). Globalmente, 12% de todas as mortes de indivíduos maiores de 30 anos podem ser atribuídas ao cigarro, decorrentes principalmente de problemas respiratórios, cardiovasculares ou câncer (OMS, 2012).

Não há levantamentos epidemiológicos avaliando os efeitos de sua associação. Portanto, faz-se necessária essa avaliação, além da proposição de modelos animais que mimetizem a condição humana de uso concomitante de álcool e cigarro.

Para o estudo dos efeitos da associação entre álcool e cigarro, criamos recentemente o Laboratório de Álcool e Tabaco (LAT), situado no ICBS-UFRGS, sala 204-A. Nesse laboratório, câmaras especiais permitem a exposição de ratos à fumaça do cigarro. Associado a essa exposição, passamos a administrar álcool por via oral, na tentativa de elucidar os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e farmacológicos relacionados ao uso concomitante dessas duas drogas de abuso.

Entender os detalhes envolvidos pelo uso concomitante dessas duas drogas de abuso pode auxiliar no desenvolvimento de fármacos que possam prevenir a dependência ou mesmo aliviar sinais de abstinência, reduzindo a recaída. Tais resultados poderiam contribuir para redução de risco associado ao uso dessas drogas.

No momento, este estudo pretendeu responder algumas questões relacionadas a essa associação, no que se refere à potencialização dos efeitos deletérios dessas duas drogas sobre a proliferação neuronal hipocampal e funções de memória em ratos. Nossa hipótese inicial era de que a associação entre álcool e fumaça de cigarro potencializaria os

efeitos deletérios das drogas isoladas, reduzindo a taxa de proliferação celular hipocampal ainda mais, e afetaria negativamente a memória de trabalho e a de longa duração em ratos.

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o efeito da associação do álcool e da fumaça de cigarro sobre a proliferação celular hipocampal e memória em ratos.

3.2 Específicos

- Avaliar alterações de proliferação celular hipocampal em ratos expostos cronicamente ao etanol, à fumaça do cigarro ou à sua associação;
- Avaliar alterações de aprendizado e memória de trabalho em ratos expostos cronicamente ao etanol, à fumaça do cigarro ou à sua associação, utilizando o teste de reconhecimento espontâneo de objetos;
- Avaliar alterações de aprendizado e memória de longa duração em ratos expostos cronicamente ao etanol, à fumaça do cigarro ou à sua associação, utilizando o teste de esQUIVA INIBITÓRIA;
- Determinar variações de parâmetros metabólicos (variações de peso corporal, ingestões hídrica e de ração) e bioquímicos (glicemia, colesterol total e HDL, transaminases, ureia e creatinina), em ratos expostos cronicamente ao etanol, à fumaça do cigarro ou à sua associação.

4. Materiais e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos Wistar machos, adultos, com peso corporal entre 250 e 270 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Os animais foram mantidos em grupos de 5, em caixas de polipropileno (33 x 17 x 40 cm), sob condições de iluminação claro/escuro de 12 horas, temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade (55%) controladas. Durante todo o experimento, os animais tinham livre acesso à água e ao alimento e eram pesados a cada 3 dias para ajuste das doses. O projeto foi aprovado pelo CEU-UFRGS, sob o número 19.566.

4.2 Soluções e exposição à fumaça do cigarro

A solução alcoólica foi preparada com etanol (95%, Labsynth, São Paulo, SP), em concentração de 20 % (peso/volume), diluído em solução glicosada a 5%. Os animais controle recebiam, via gavagem, apenas solução glicosada no volume de 10 mL/kg. A dissolução do etanol na solução glicosada, utilizada com o objetivo de aumentar a palatabilidade da solução alcoólica, foi feita imediatamente antes da administração, e a solução glicosada era preparada semanalmente e mantida sob refrigeração.

O *5-bromo-2'deoxiuridine* (BrdU; Amersham Biosciences do Brasil Ltda, São Paulo, SP) foi dissolvido em solução de NH_4OH , 0,1 M, levemente aquecida para completa dissolução, na concentração final de 100 mg/kg/mL, preparada imediatamente antes das administrações.

A exposição à fumaça do cigarro se deu em câmaras hermeticamente fechadas, com fluxo de ar de 10 L/min, mantido constante por bomba de vácuo, de acordo com o modelo proposto por Pereira e colaboradores (2007). Nestas câmaras, os animais foram agrupados em número de 5 e expostos à fumaça de cigarro (Marlboro Gold, Philip Morris Brasil,

Campinas, SP) ou ao ar ambiente, de acordo com o grupo ao qual pertenciam. Segundo o fabricante, esse cigarro contém 0,8mg de nicotina por unidade. A concentração de monóxido de carbono dentro da câmara foi monitorada com aparelho manual (Bacharach Monoxor II, PA, USA), de modo a manter as mesmas condições para todos os animais.

4.3 Procedimentos Experimentais

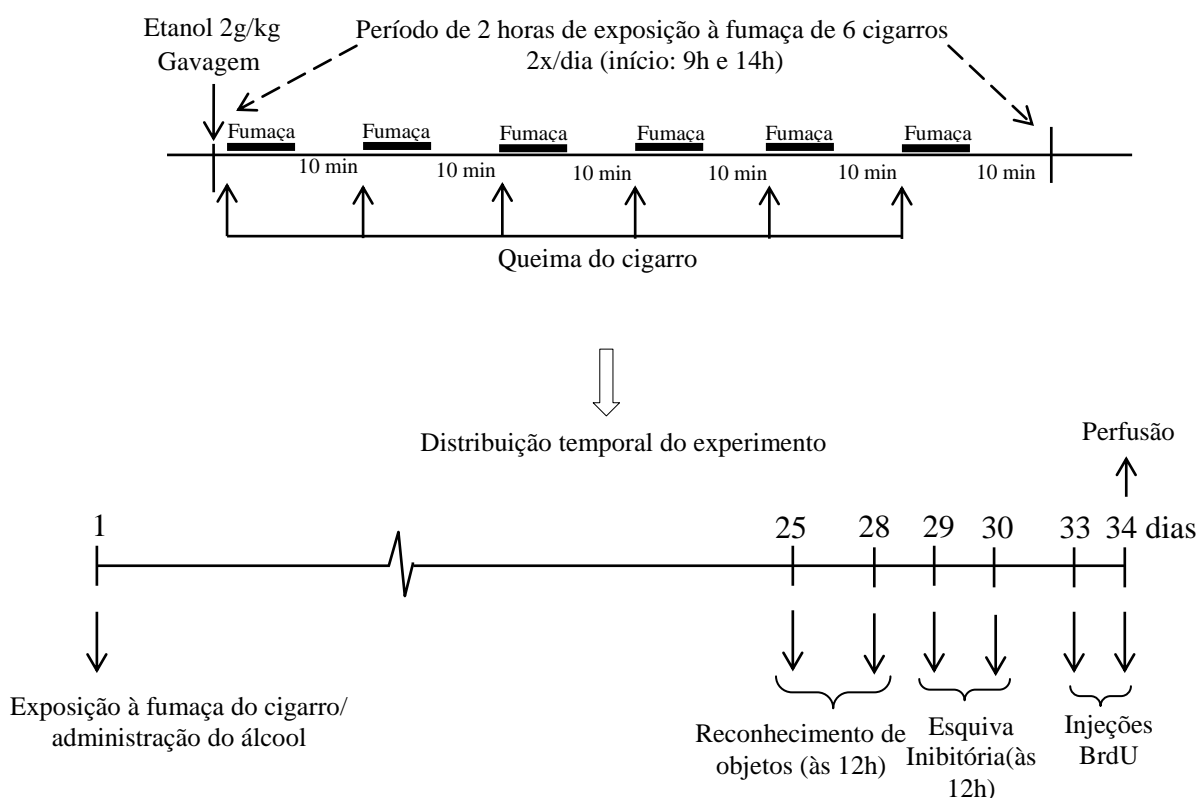
Os animais foram aleatoriamente divididos em grupo controle (CTR, n = 20) e grupo álcool (ALC, n = 20), recebendo solução glicosada ou solução alcoólica, na dose de 2 g/kg, via gavagem, respectivamente. Essa dose foi selecionada com base em estudos anteriores e é considerada representativa de consumo moderado de bebida alcoólica. Imediatamente após a administração das soluções, os animais foram subdivididos e colocados em câmaras (n = 5 animais/câmara), com ventilação de ar ambiental ou saturado com fumaça de cigarro (TAB e ALCTAB). Pela manhã, durante duas horas, foram expostos à fumaça de 6 cigarros, com intervalo de 10 minutos entre eles (Esquema 1). Este procedimento se repetia à tarde, com intervalo mínimo de 2 horas entre as exposições. A concentração de monóxido de carbono era monitorada durante a queima do cigarro e durante os intervalos, por meio de um pequeno tubo na parte superior da caixa, aberto nos tempos 1, 3, 5 e 7 minutos, para introdução da haste do aparelho.

Os animais foram tratados por 34 dias. Do 25º ao 27º dia, foram habituados ao ambiente do teste de reconhecimento de objetos e no 28º dia, testados para avaliação dos efeitos da associação entre álcool e cigarro sobre memória de trabalho (Esquema 1). No 29º dia, foram treinados para o teste de esQUIVA inibitória, sendo avaliados, 24 horas após, para a memória de longa duração. Ambos os testes foram realizados 60 minutos após o término da primeira exposição à fumaça do cigarro, perfazendo 3 horas da administração

do álcool.

No 33º dia, os animais receberam a primeira dose de BrdU, 100mg/kg, via intraperitoneal, seguindo-se outra administração, no 34º dia, 2 horas antes do início da perfusão transcardíaca, realizada sob anestesia geral (cetamina e xilazina - 50:10 mg/kg) por via intraperitoneal, e programada para ocorrer depois da queima do 3º cigarro, para posterior fixação e retirada do encéfalo. Nesse mesmo dia, alguns animais foram mortos por decapitação, e o sangue troncular foi coletado para determinação de variações dos parâmetros bioquímicos.

Esquema 1 – Procedimento experimental



Durante todo o período experimental os ratos foram monitorados quanto ao ganho de peso corporal, ingestões hídrica e de ração, sendo avaliados duas vezes por semana,

todas as segundas e quintas-feiras.

4.4 Avaliação da memória de trabalho: teste de reconhecimento espontâneo de objetos

Para avaliação da memória de trabalho, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos. O equipamento consistia de uma caixa, de cor ocre, onde os animais foram habituados por 3 dias consecutivos, por um período de 10 minutos (Figura 1). No dia do teste, os ratos foram colocados nessa mesma arena, por 3 minutos, sendo-lhes apresentados dois objetos iguais (A1 e A2). Após, os animais retornaram à caixa de residência por 1 minuto, enquanto a arena foi higienizada e um dos objetos (A2), foi substituído por outro objeto com cor e geometria diferentes (B), não familiares.

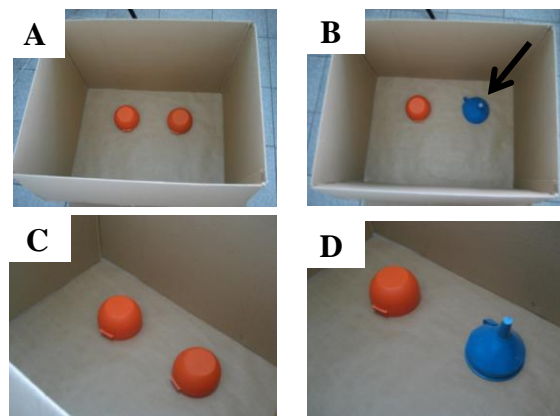


Figura 1. Aparato utilizado para o teste de reconhecimento espontâneo de objetos para avaliação de memória de trabalho em ratos. A: objetos iguais, B: objeto novo introduzido no ambiente (→). C e D: detalhes dos objetos.

Os animais foram colocados novamente na caixa, e seus comportamentos observados por 3 minutos, para análise do tempo de investigação dos objetos (cheirar ou morder), considerando-se a distância mínima de 2 cm dos mesmos. A exploração dos objetos foi registrada por câmara filmadora, sendo a investigação dos objetos (A1+A2)

tomada como medida de ambulação (Jobim et al., 2012). O índice de reconhecimento do objeto foi calculado pela fórmula (IR): $B/(A1 + B)$, sendo B o objeto não familiar e A1 o objeto familiar. Este teste é descrito para avaliação da memória de trabalho (Izquierdo et al., 1998).

4.5 Avaliação da memória de longa duração: esQUIVA INIBITÓRIA

Para avaliação da memória de longa duração, foi utilizado o teste da esQUIVA INIBITÓRIA. O aparelho consiste de uma caixa de madeira automatizada (50 x 25 x 25 cm). O assoalho da caixa é constituído por uma grade de barras metálicas conectadas a uma fonte de eletricidade. Num dos cantos da caixa, há uma plataforma com altura de 7 cm, sobre a qual o animal é colocado no primeiro dia de treino, virado com a cabeça para a parede da caixa. Após alguns segundos de atividade exploratória, o animal tende a descer dessa plataforma para a grade metálica. No momento em que o rato toca com as quatro patas nas barras metálicas, ele recebe um choque intermitente de 0,4mA, por 2 segundos (Figura 2).



Figura 2. Aparelho de EsQUIVA INIBITÓRIA, conectado à fonte elétrica (0,4mA, 2 s), para avaliação da memória de longa duração (24 horas) em ratos.

O teste é realizado 24 horas após o treino, quando cada animal é colocado novamente na mesma caixa de tarefa sobre a plataforma, em condições idênticas ao treino, com exceção de que não há choque presente. O tempo de descida da plataforma é

novamente registrado, sendo este, o índice de memória da tarefa. Os animais que aprenderam e consolidaram a memória aversiva da tarefa permaneceram por mais tempo sobre a plataforma. O índice de aprendizado foi considerado como o tempo para descida da plataforma no teste, dividido pelo somatório do tempo no dia do treino e no dia do teste ($\text{Índice de aprendizado} = t_{\text{teste}}/t_{\text{treino}} + t_{\text{teste}}$). Para todos os grupos, o teto máximo de permanência foi de 180 segundos (Izquierdo et al., 2002).

4.6 Proliferação celular: Imunoistoquímica do BrdU

Para avaliação do efeito da exposição crônica ao álcool e ao cigarro sobre a proliferação neuronal hipocampal, os animais receberam, nos dias 33º e 34º, via intraperitoneal, 100 mg de BrDU, um análogo sintético da timidina, incorporado na Fase S ao DNA das células em replicação. No 34º dia, após 2 horas da administração do BrDU, os ratos foram anestesiados com cetamina e xilasina (50:10 mg/kg), iniciando-se perfusão transcardíaca com salina, seguida de fixação do encéfalo com solução de paraformaldeído. Os encéfalos foram posteriormente incluídos em parafina, contendo polímeros plásticos (Paraplast®, Sigma Aldrich, São Paulo, SP) e seccionados em fatias de 4 µm, no micrótomo, obtendo-se 10 cortes coronais por animal, com intervalos de 50 µm entre os cortes. A imunoistoquímica para quantificação das células marcadas foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do *kit* de BrDU (Amersham Biosciences do Brasil Ltda, São Paulo, SP; 1:100). O intestino foi utilizado como controle positivo. As células imunorreativas (cor marrom) presentes na camada granular (GCL) e na zona subgranular (SGZ) do giro denteado, no hipocampo, foram quantificadas em microscópio (40X). Os dados foram expressos como a média de células BrdU marcadas em ambos os hemisférios. Foram consideradas como pertencentes à GCL as células que estavam até dois núcleos de distância do giro denteado (Piazza et al., 2010).

4.7 Análises bioquímicas e alcoolemia

O sangue coletado foi centrifugado, e o soro, congelado até o momento das análises bioquímicas. Glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL, bem como Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), ureia, creatinina e Gama – Glutamiltransferase (GGT), foram determinados pelo emprego de *kits* (Wiener, Buenos Aires, Argentina), por método colorimétrico ou enzimático, em aparelho automatizado (CT 600 I, Labimbráz, Buenos Aires, Argentina). A concentração de álcool no soro de 4 animais que receberam esta substância foi determinada por cromatografia gasosa.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram reunidos em banco de dados e foi feita análise de variância (ANOVA) de uma via, considerando como variáveis dependentes os diferentes tipos de exposição. Para avaliações semanais de ganho de peso corporal, consumos hídrico e de ração, foi utilizada análise de variância de uma via de medidas repetidas. Quando detectada diferença significativa, foi utilizado o teste de Bonferroni para detecção de diferença entre os grupos. Os resultados foram representados como média \pm erro padrão, sendo considerados significativos os resultados com $P < 0,05$. O software utilizado nas análises foi o Sigma Stat (Jandel Cientific Co., San Jose, CA – 11.0).

5. Resultados

5.1 Proliferação celular

Nossos resultados mostraram que o álcool e a associação álcool e tabaco reduziram significativamente a proliferação celular no giro denteado de ratos tratados cronicamente ($P_{\text{álcool}} = 0,030$ e $P_{\text{associação}} = 0,006$, respectivamente) (Figura 3).

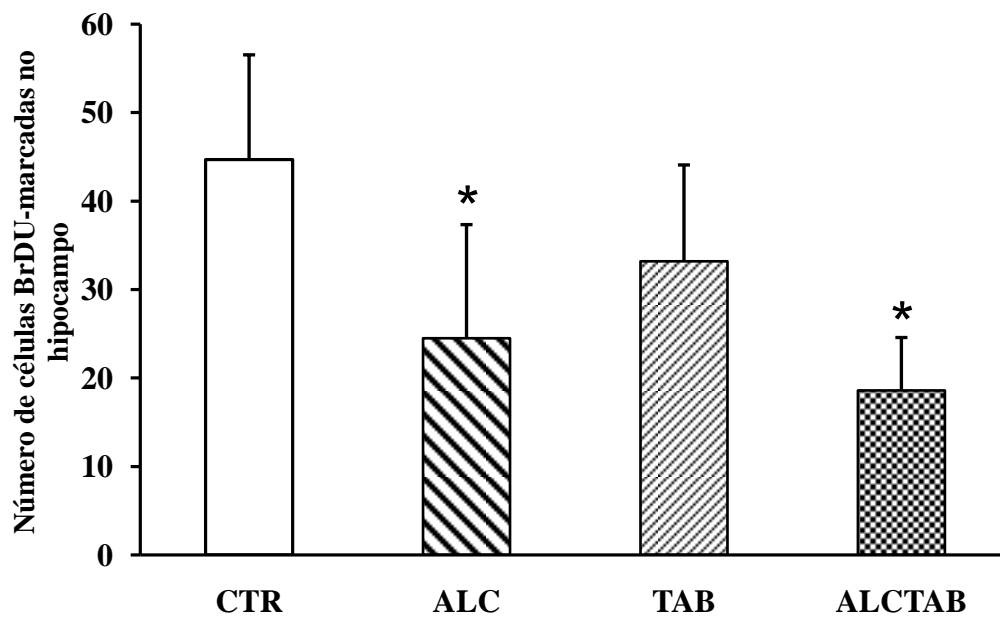
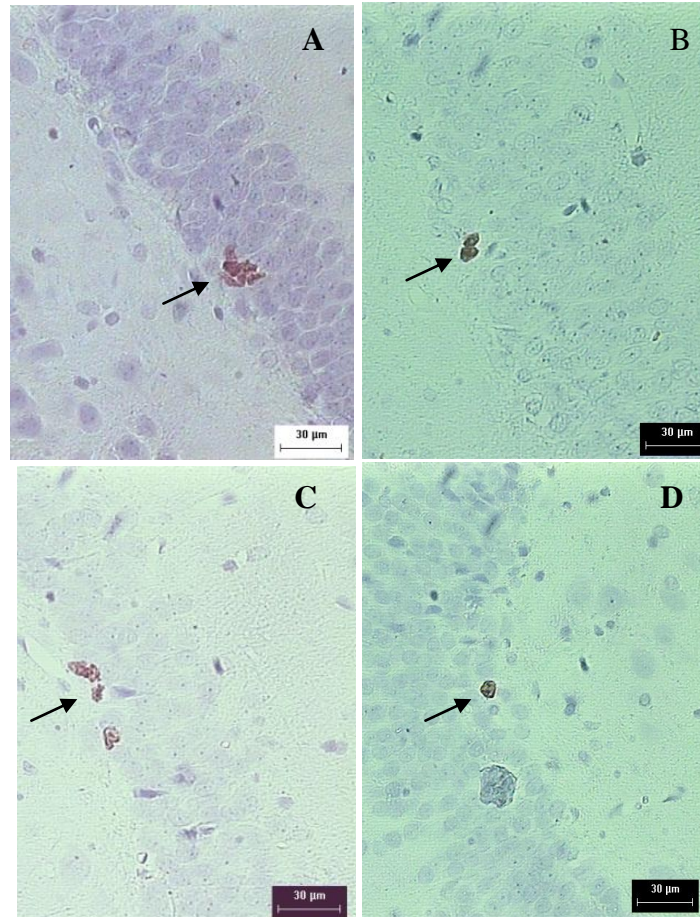
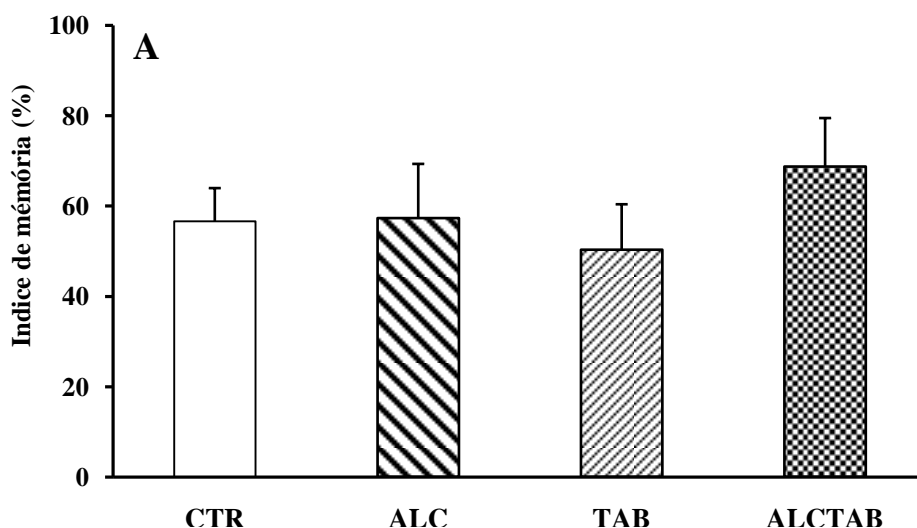


Figura 3. Fotos e gráfico. Efeito da exposição crônica ao álcool (ALC) (B), fumaça de cigarro (TAB) (C) ou sua associação (ALCTAB) (D) sobre a proliferação celular hipocampal de ratos. $n = 10/\text{grupo}$; ANOVA-1 via + Bonferroni. Resultados expressos como média \pm erro padrão. * Diferente do controle (CTR) (A) $P < 0,05$.

O número de células marcadas foi 40% menor para o grupo do álcool, enquanto a associação álcool e cigarro reduziu essa marcação em cerca de 60%. Embora não apresentando diferença estatisticamente significativa, observamos uma redução de 26% na proliferação hipocampal de ratos expostos apenas à fumaça do cigarro ($P = 0,601$).

5.2 Memória de trabalho e memória de longa duração

Adicionalmente, mostramos aqui, que nas nossas condições experimentais, álcool, cigarro ou sua associação não afetaram a memória de trabalho e a de longa duração (Figuras 4 e 5). Esses resultados não podem ser atribuídos a comprometimento da ambulação, uma vez que, no primeiro dia do teste de reconhecimento de objetos, não observamos diferença entre os grupos na exploração dos dois objetos (Figura 4-B, $P = 0,166$).



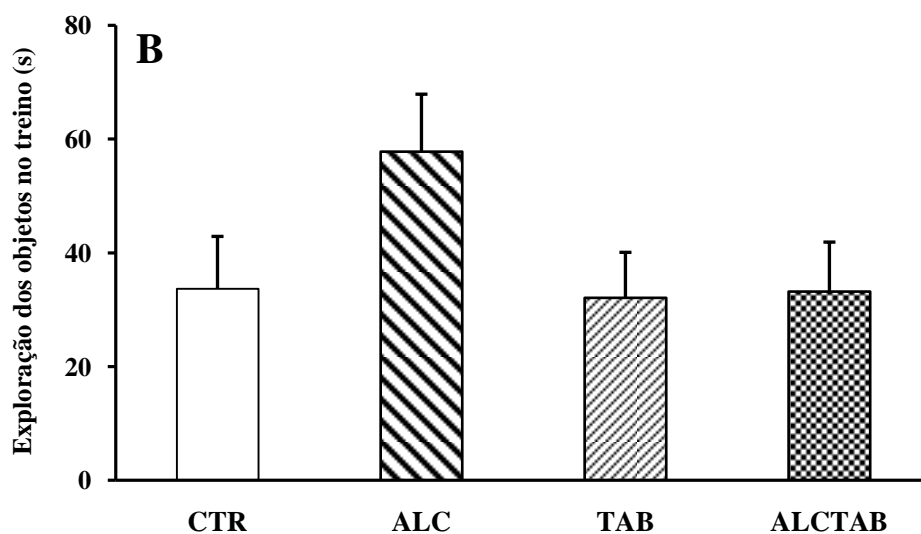


Figura 4. Efeito da exposição crônica ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB) sobre a memória de trabalho de ratos, avaliada no teste de reconhecimento espontâneo de objetos. A: índice de memória; B: exploração dos objetos no momento do treino. n = 10/grupo; ANOVA-1 vias. Resultados expressos como média \pm erro padrão.

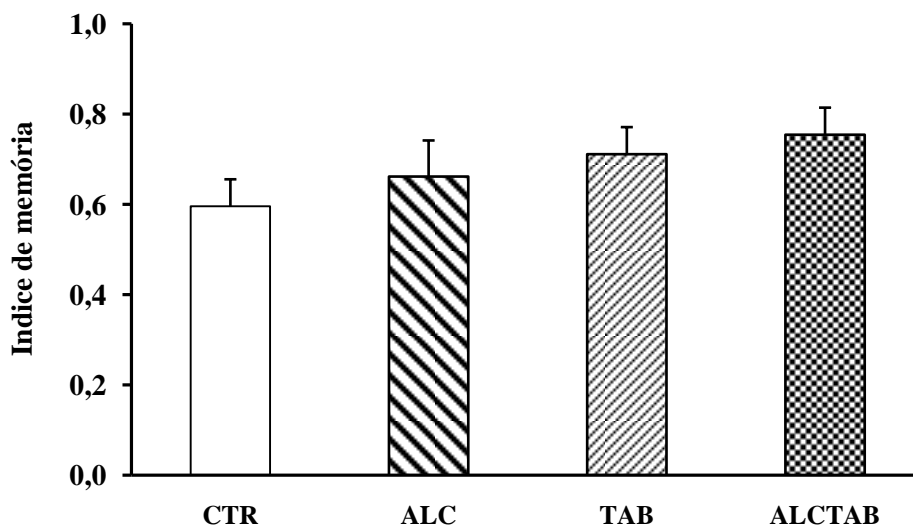


Figura 5. Efeito da exposição crônica ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB) sobre a memória de longa duração em ratos, avaliada na tarefa de esquiva inibitória. n = 10/grupo; ANOVA-1 vias. Resultados expressos como média \pm erro padrão.

5.3 Concentração de monóxido de carbono na câmara de exposição e alcoolemia

Como observado na Figura 6, a concentração de monóxido de carbono variava ao longo do tempo de 2 horas de experimentação, comprovando a eficiência do sistema de exposição à fumaça do cigarro para prevenir intoxicação por monóxido de carbono. Cada cigarro levava entre 8 e 10 minutos para queimar, sendo avaliada a concentração de monóxido apenas nos tempos de 1, 3, 5 e 7 minutos durante a queima (Figura 6A). Após a queima de cada cigarro circulava ar ambiental pela câmara, por 10 minutos, de modo que os ratos pudessem se recuperar desse período de exposição. Também para esse intervalo foi avaliado o decréscimo da concentração de monóxido de carbono (Figura 6B) nos tempos 1, 3, 5 e 7 minutos.

A concentração de álcool nas amostras de sangue de 4 animais que receberam esta substância foi determinada por cromatografia gasosa, obtendo-se valores de $0,6 \pm 0,2$ mg/dL, após 2 horas da última administração. Essa concentração é semelhante à observada em experimento piloto, avaliando a biodisponibilidade do álcool em administração de 2 g/kg, em ratos (dados não publicados).

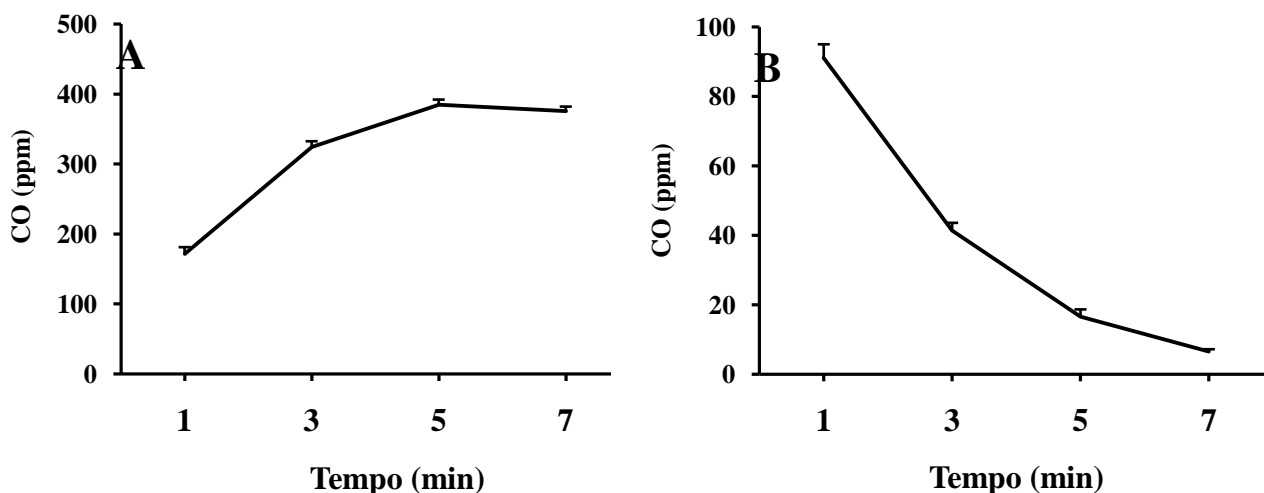


Figura 6. Concentração de monóxido de carbono durante a queima do um cigarro (A) ou durante o intervalo da queima (B). O tempo máximo de queima do cigarro como o intervalo entre a queima de um e outro cigarro era de 10 minutos.

5.4 Peso corporal, consumos alimentar e hídrico

Para avaliar os efeitos da exposição crônica ao álcool, fumaça do cigarro ou sua associação sobre parâmetros metabólicos, acompanhamos alterações no peso corporal, ingestão hídrica e de ração ao longo do experimento.

A figura 7 mostra o aumento semanal significativo do peso dos animais, conforme esperado ($P < 0,001$). No entanto, o ganho de peso médio foi maior para os ratos tratados com álcool (ALC), mesmo quando este era associado à fumaça do cigarro (ALCTAB) ($P = 0,032$), em comparação aos grupos CTR e TAB. De fato, após a 4ª semana, o ganho de peso para os grupos ALC e ALCTAB foi de cerca de 40 g, enquanto os CTR e TAB ganharam menos de 15g.

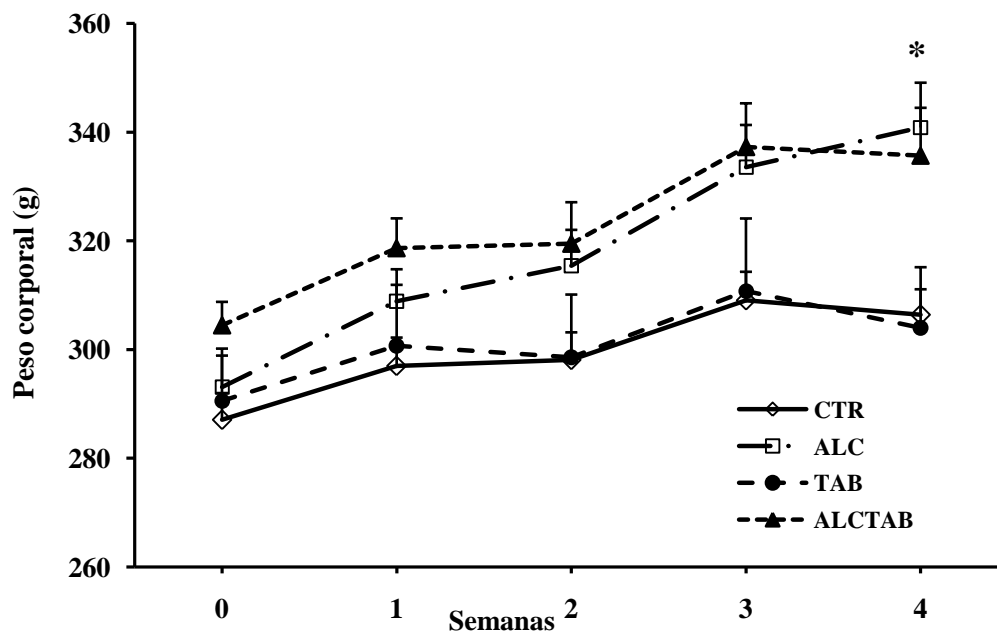


Figura 7. Efeito da exposição crônica ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB) sobre o ganho de peso semanal em ratos. $n = 10$ /grupo;

ANOVA-1 via de medidas repetidas + Bonferroni. Resultados expressos como média \pm erro padrão; * Diferentes de CTR e TAB, $P = 0,032$.

Embora todos os ratos tenham ganhado peso, o consumo de ração reduziu de modo não significativo em torno de 3,5 g ao longo do experimento (Figura 8). Apenas o grupo TAB apresentou consumo mais elevado na 3ª semana, diferenciando-se dos ratos do grupo ALC ($P = 0,012$). Esta tendência de aumento do consumo já pode ser percebida na segunda semana para este grupo TAB, pois, enquanto os ratos CTR e ALC reduziram em torno de 10% a ingestão de ração/semana, o grupo ALCTAB reduziu 6% e o grupo TAB reduziu apenas 4%.

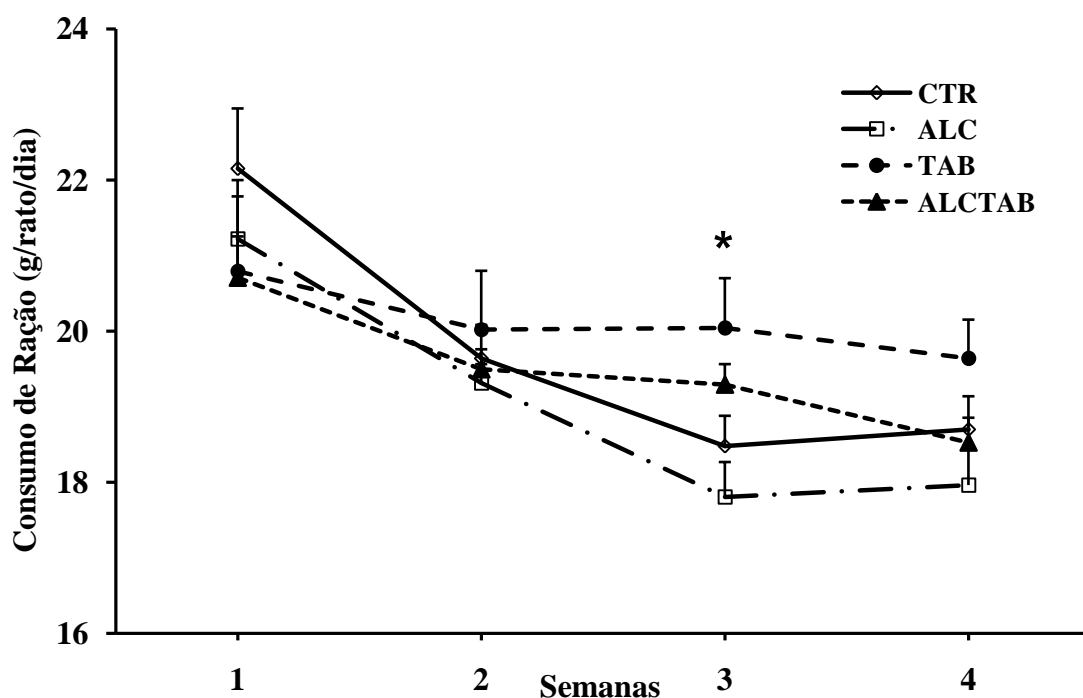


Figura 8. Consumo diário de ração de ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB), ao longo de 4 semanas. $n = 10$ /grupo; ANOVA-1 via de medidas repetidas + Bonferroni. Resultados expressos como média \pm erro padrão; * Diferentes de ALC, $P = 0,012$.

Para a ingestão hídrica, observamos que, já na primeira semana, os animais dos grupos ALC e ALCTAB ingeriram significativamente mais água que os grupos CTR e TAB ($P < 0,001$) (Figura 9). Porém, após a 3ª semana, apenas o grupo associação ALCTAB ingeriu mais água que os demais ($P < 0,001$).

O consumo médio de água ao longo do experimento, para os ratos do grupo CTR, foi de 15 mL/dia, enquanto que o grupo associação ALCTAB consumiu em média 21 mL/dia, resultando em incremento de 36% do consumo de água.

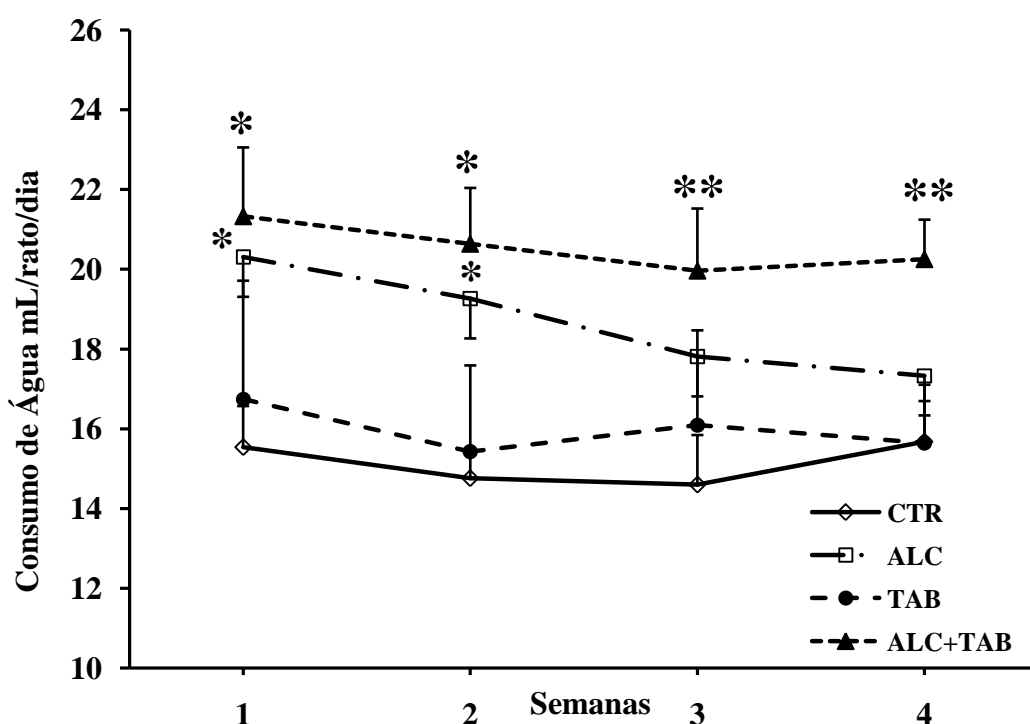


Figura 9. Consumo diário de água por ratos expostos ao álcool (ALC), fumaça de cigarro (TAB) ou sua associação (ALCTAB) ao longo de 4 semanas. $n = 10$ /grupo; ANOVA-1 via de medidas repetidas + Bonferroni. Resultados expressos como média \pm erro padrão; * Diferentes de CTR e TAB, $P < 0,001$; ** Diferente de CTR, ALC e TAB, $P < 0,001$.

5.5 Parâmetros bioquímicos

A administração de álcool(2g/kg), ou a exposição à fumaça de seis cigarros, duas vezes ao dia, por 30 dias, aumentou significativamente ($P < 0,001$) a glicemia dos animais. Para o grupo ALC esse aumento foi de 10%, enquanto que, para o grupo ALCTAB, foi de 13%, mais do que o dobro do que para aqueles expostos apenas à fumaça do cigarro (TAB: 6%).

Enquanto no grupo ALC, houve aumento significativa concentração plasmática de triglicerídeos (38%), sem afetar colesterol total ou HDL, no grupo cigarro houve redução de todos estes parâmetros (50%, 13% e 18,5%, respectivamente). Porém, no grupo da associação entre álcool e fumaça do cigarro, os valores de triglicerídeos foram similares ao grupo controle, mas mantiveram-se os níveis de colesterol total (19,3%) e de HDL mais baixos (18,7%).

Tabela 1- Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou associação entre essas duas drogas de abuso (ALCTAB) sobre alguns parâmetros metabólicos no plasma de ratos.

Grupos	n	Glicose (g/dL)	Triglicerídeos (g/dL)	Colesterol total (g/dL)	HDL (g/dL)
CTR	10	127.8±4.5	95.3±5.4	45.4±4.1	25.4 ±1.9
ALC	9	141.0±3.3^a	131.6 ±4.9^{a,c,d}	48.4±2.6	26.4±2.3
TAB	10	135.6±3.6^a	47.8 ±5.8^{a,c,d}	39.1±2.5^{a,b}	20.7±1.1^{a,b}
ALC+TAB	10	144.6±2.9^{a,c}	96.8 ± 6.6	36.9 ±1.7^{a,b}	20.5±1.1^{a,b}
P		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

a: diferente do CTR; b: diferente do ALC ; c: diferente do TAB; d: diferente de ALC+TAB; ANOVA-1 vias + Bonferroni. Média ± desvio padrão;

Outros parâmetros também foram avaliados (Tabela 2) e revelaram que o álcool isoladamente reduz significativamente AST (17%) e ureia (17,2%), enquanto a fumaça do cigarro está associada à redução de AST (14,5%) e aumento de creatinina (32,5%). A associação entre álcool e tabaco reduziu significativamente a ureia (24%) e aumentou a gama-GT (200%).

Tabela 2 - Efeito da administração crônica de álcool (ALC), exposição à fumaça do cigarro (TAB) ou associação entre essas duas drogas de abuso (ALCTAB) sobre parâmetros bioquímicos no plasma de ratos.

Grupos	n	AST (g/dL)	ALT (g/dL)	Creatinina (g/dL)	Ureia (g/dL)	Gama-GT (g/dL)
CTR	10	240.9 ± 14.2	83.1±8.6	0.40 ±0.01	44.7±2.9	0.7±0.9
ALC	9	199.7±6.8^{a,d}	83.7±7.1	0.38 ±0.03 ^d	37.0± 2.9^a	1.1±0.7
TAB	10	205.9 ± 14.9^{a,d}	81.7±5.9	0.53 ± 0.04^{a,b,d}	40.9 ± 2.3	1.4± 0.8
ALCTAB	10	230.3 ± 21.9	86.7±2.9	0.43 ±0.01	34.0± 2.6^{a,c}	2.1±1.1^a
P		< 0.001	0.540	< 0.001	< 0.001	0.041

a: diferente do CTR; b: diferente do ALC ; c: diferente do TAB; d: diferente de ALC+TAB;ANOVA-1 via + Bonferroni. Média ± desvio padrão.

6. Discussão

6.1 Proliferação celular

Mostramos aqui que a exposição crônica ao álcool e fumaça do cigarro reduz em 60% a proliferação celular hipocampal de ratos. Em humanos, estudos por neuroimagem mostram que o volume hipocampal está diminuído em dependentes de álcool (Mechtcheriakov et al., 2007). Aqui nós mostramos que o álcool, isoladamente, reduz a proliferação neuronal em ratos, após administração de 2g/dia, duas vezes ao dia, por 34 dias. Nossos resultados corroboram com outros que também avaliaram uso crônico de álcool e observaram redução de 40% a 60% da taxa de proliferação celular (células BrDU-marcadas), independentemente da via de administração (intraperitoneal, gavagem, água ou ração) ou regime de administração (agudo ou crônico) (Anderson et al., 2012; Jang et al., 2002). Divergindo desses resultados, Rice e colaboradores(2004), observaram aumento não significativo de cerca de 20% das células marcadas com BrDU em camundongos tratados por 4 semanas com dieta líquida contendo álcool. Aqueles autores sugeriram que o uso crônico de álcool produziria uma resposta compensatória, restabelecendo a taxa de proliferação de células progenitoras, na dependência da dose administrada (Rice et al.,

2004). Para o grupo de ratos expostos apenas à fumaça do cigarro, observamos uma redução não significativa de 26% na proliferação celular. Esse é o primeiro estudo a avaliar o efeito da fumaça do cigarro sobre a proliferação celular hipocampal de ratos. Outros estudos avaliaram apenas o efeito da administração de nicotina. Os resultados observados com a administração de nicotina mostram que sua autoadministração, por 2 semanas, não altera o número de células BrDU-marcadas (Wei et al., 2012); porém, o tratamento por 4 ou 8 semanas reduz em 40 a 50% o número de células marcadas no hipocampo de ratos adultos (Abrous et al., 2002; Wei et al., 2012). A infusão contínua de 4mg/kg/dia de nicotina, por 10 dias, também reduz em mais de 60% a proliferação celular no hipocampo de ratos, enquanto doses menores, como 0,25 mg/kg/dia, não afetam a taxa de proliferação (Scerri et al., 2006). A administração dessa menor dose de nicotina está associada a concentrações plasmáticas em torno de 7ng/mL, comumente encontrada no plasma de fumantes leves a moderados (Rose et al., 2004). No nosso modelo experimental, os animais foram expostos à fumaça do cigarro, de modo intermitente, 2 horas pela manhã e 2 horas à tarde, aspirando a fumaça de 6 cigarros contendo nicotina e outras substâncias, mimetizando condições humanas de uso. Acreditamos que a exposição continuada, por 30 dias, a quantidades moderadas de fumaça do cigarro seja responsável pela redução de apenas 26% da proliferação celular. Não descartamos que o aumento do número de cigarros por exposição ou prolongamento do tratamento não possam mudar esses resultados.

Nosso principal objetivo aqui foi avaliar o efeito da associação entre álcool e cigarro sobre proliferação celular hipocampal de ratos tratados/expostos cronicamente a essas duas drogas de abuso. Observamos que a associação entre elas reduziu em cerca de 60% o número de células BrDU-marcadas. Um único estudo avaliando o efeito da associação entre álcool e nicotina, mas não a fumaça do cigarro, mostrou redução de 59%

na proliferação neuronal no hipocampo de ratos (Janget al., 2002). Esse mesmo estudo mostrou redução significativa das células de BrDU-marcadas também no grupo tratado apenas com nicotina (\downarrow 39%). Embora a redução da proliferação tenha sido semelhante à obtida no nosso estudo, esses resultados não são comparáveis, uma vez que aqueles autores utilizaram altas doses de nicotina (1 mg/kg/dia) associadas ao álcool (2g/kg/dia), por via intraperitoneal, por apenas 3 dias (Jang et al., 2002). De acordo com nossos resultados, o tratamento crônico com o álcool interfere mais importante sobre a taxa de proliferação celular (40%), enquanto o cigarro apresenta efeito modesto e não significativo (26%). No entanto, a associação entre álcool e cigarro parece reduzir ainda mais a taxa de proliferação celular (60%), sugerindo um possível efeito deletério aditivo sobre a proliferação hipocampal. Tais resultados poderiam justificar maior risco de déficit cognitivo, de memória e doenças psiquiátricas em usuários de álcool e tabaco (Greenstein et al., 2010, Hurley et al., 2012).

6.2 Memória de trabalho e memória de longa duração

Portanto, sob nossas condições experimentais, não observamos alteração da memória de trabalho e memória de longa duração após tratamento crônico com álcool, fumaça de cigarro ou sua associação. Estudos avaliando o efeito do uso do álcool sobre a memória são controversos e muitos revelam dependência do tempo de uso, dose utilizada, via de administração e alcoolemia no momento de aprendizado ou execução da tarefa. Em seres humanos, o uso agudo de álcool afeta negativamente a cognição e a tomada de decisões, quando as concentrações plasmáticas estão próximas de 50 mg/dL (Friedman et al., 2011). Contudo, doses diárias moderadas de álcool parecem aumentar o desempenho em algumas tarefas e promover neuroproteção (Panza et al., 2012). Em animais, a maioria dos testes avalia prejuízo cognitivo e de memória pela administração aguda de álcool,

imediatamente antes do aprendizado ou durante o período de retenção. Doses elevadas, como 2,4 g/kg de álcool, administradas via intraperitoneal, antes ou após o treino, interferem negativamente sobre a cognição e memória em camundongos (Sanday et al., 2013). Adicionalmente, doses baixas de 1,25 g/kg de álcool não comprometem a memória, enquanto doses maiores, como 1,75 g/kg, afetam a memória espacial e doses de 2,25 g/kg comprometem tanto memória espacial quanto não espacial nessa mesma espécie animal (Berry e Matthews, 2004). Interessantemente, doses ainda menores como 0,25 g/kg de álcool, ao contrário, melhoram a memória em camundongos, cuja alcoolemia é de cerca de 50 mg/mL (Gulick et al., 2008). Nosso planejamento experimental tinha como objetivo avaliar o efeito da administração crônica do álcool sobre a memória e não o efeito dele *per se*. Por isso, escolhemos treinar os animais apenas após 180 minutos da administração do álcool, quando a alcoolemia era inferior a 50 mg/dL. Para a esQUIVA inibitória, que prevê 24 horas entre o treino e o teste, os animais receberam a segunda dose diária apenas após 120 minutos do treino. Portanto, para ambos os testes não observamos interferência do álcool sobre processos de aprendizagem e consolidação da memória. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores que também não observaram prejuízo cognitivo na esQUIVA inibitória após 120 minutos da administração de 2 g/kg álcool, mesmo sendo administrado via intraperitoneal (Bammer e Chesher, 1982). Porém não podemos descartar efeitos de tolerância ao álcool, pois a administração de 2 g/kg de álcool por 15 dias, via intraperitoneal, ou por 15 dias na dieta, ou ainda por 45 dias na água de beber também não afetam a memória em roedores (Abreu-Villaça et al., 2012; Anderson et al., 2012; Garcia-Moreno e Cimadevilla., 2012).

Um único estudo, avaliando o efeito da fumaça do cigarro sobre a memória em camundongos adolescentes, mostra que a memória de longa duração esta comprometida pela exposição por 15 dias à fumaça do cigarro (Abreu-Villaça et al., 2012). No entanto,

não descartamos que o tempo de exposição, de 8 horas/dia naquele estudo, e o fato de serem camundongos adolescentes possam justificar as discrepâncias com nossos resultados. Mais comuns são os estudos avaliando o efeito da nicotina, tanto em seres humanos quanto em roedores (Heishman et al. 2010; Gould e Higgins 2003; Kenney e Gould 2008; Hahn et al., 2002, Puma et al, 1999). Como já foi dito, em seres humanos, cigarro ou nicotina aumentam o controle motor fino, o estado de alerta e a memória de trabalho (Heishman et al., 2010; Kleykamp et al., 2011). Em ratos, a administração subcutânea de nicotina aumenta, de modo dependente de dose, o número de acertos e acelera o tempo de reação (Hahn et al., 2002). De fato, apenas doses superiores a 0,2 g/kg, via intraperitoneal, administrada antes do treino parecem melhorar a memória de trabalho em ratos (Puma et al., 1999). Da mesma forma, apenas doses maiores de nicotina são capazes de melhorar o desempenho de ratos em testes para avaliar memória de longa duração, sendo que doses menores, como 0,1 mg/kg ou 0,5 mg/kg, via intraperitoneal não afetam a memória de ratos (Haroutunian et al., 1985). Abreu-Villaça e colaboradores(2012), avaliaram a concentração de cotinina, o mais importante metabólito plasmático da nicotina, após 4 horas de exposição contínua à fumaça do cigarro, e detectaram concentrações em torno de 68 ng/dL. É de se supor que, sob nossas condições experimentais, após 1 hora da última exposição à fumaça do cigarro, a concentração de nicotina plasmática fossem muito baixas. Isso poderia justificar, em parte, o motivo pelo qual não observamos alteração da memória. Além disso, não descartamos efeitos de tolerância aos efeitos que melhoram a memória pelo uso crônico da nicotina, presente na fumaça do cigarro.

Para a associação álcool e cigarro, estudos mostram que álcool e cigarro não melhoram a memória de trabalho em seres humanos (Greenstein et al., 2010). Em camundongos adolescentes, a exposição à fumaça de cigarro por 15 dias (8 h/dia) em

associação com a administração de 2 g/kg de álcool, via intraperitoneal, afetou negativamente a memória apenas nos camundongos expostos à fumaça ou à sua associação com álcool. Porém, o álcool, isoladamente, não afetou processos de consolidação de memória, após 24 horas do treino (Abreu-Villaça et al., 2012). Estudos, avaliando o efeito da associação aguda entre álcool e nicotina mostram que, isoladamente, nem álcool (1,5 g/kg, via IP), nem nicotina (0,15; 0,3; 0,6 e 1,2 mg/kg, via subcutânea) afetam a memória de trabalho em ratos testados no labirinto radial de 8 braços (Rezvani et al., 2002). Apenas a dose de 0,3 mg/kg de nicotina foi capaz de melhorar o desempenho dos ratos, quando coadministrada com 1,5 g/kg de álcool (Rezvani et al., 2002). Portanto, não só o tempo de exposição, mas também a concentração de nicotina parece determinante para detecção de alterações de aprendizado e memória dos animais.

6.3 Concentração de monóxido de carbono na câmara de exposição e alcoolemia

O modelo proposto aqui tenta mimetizar uma situação humana, em que o uso de álcool se dá por via oral, enquanto o uso de tabaco se dá por via inalatória. No nosso modelo, os animais ficam sob o efeito de diferentes concentrações de álcool, nicotina e outros produtos presentes na fumaça do cigarro, melhorando a validade de constructo, embora o padrão de consumo humano seja muito individualizado. Nossa intenção aqui não era avaliar o efeito tóxico pela exposição a essas duas drogas. Por isso, selecionamos concentração de álcool que, administrada por via oral, apresenta pico de 120 mg/dL, em 60 minutos, e mantém as concentrações plasmáticas em torno de 60 mg/dL, mesmo após 180 min da administração (dados do laboratório, não publicados).

A modelagem animal do padrão de consumo humano de cigarro também é importante, pois outros componentes da fumaça do cigarro, além da nicotina, apresentam

ação biológica. A partir do estudo da cinética da fumaça do cigarro, em diferentes tempos, pela determinação da cotinina, pretendemos estudar alterações nos sistemas neurotransmissores, como GABA e glutamato, e seu envolvimento na adição a essas duas drogas de abuso, avaliando efeitos sinérgicos ou aditivos que pudessem justificar a elevada prevalência de uso concomitante entre seres humanos.

6.4 Variações de peso corporal, consumos alimentar e hídrico

Embora os ratos do grupo ALC tenham reduzido consumo alimentar, ainda assim ganharam peso corporal. O álcool parece ser determinante para o ganho de peso, pois o grupo TAB, mesmo ingerindo 6% a mais de ração não aumentou seu peso de modo tão significativo quanto os grupos que ingeriram álcool.

Diferente dos nossos resultados, alguns estudos mostraram redução de peso corporal em animais tratados com álcool, quando comparados a ratos controle (Levine et al., 2000; Pereira et al., 2012). Tais resultados são questionáveis, pois, em muitos desses estudos, o álcool é oferecido na dieta ou água de beber, promovendo aversão e redução das ingestões alimentar e hídrica. O tratamento prolongado com álcool não só resulta em redução de peso dos animais como evidencia sinais de desnutrição (Pereira et al., 2012). Para o caso da administração por gavagem, se espera, de fato, perda de peso, pois o estresse pela contenção (Maniame Morris, 2012), bem como por pequenas eventuais lesões no esôfago reduzem o comportamento alimentar (Bronchalet al., 2008). No entanto, entre os intervalos da administração, os animais não se privam de alimento ou água. Esse modelo, portanto, poderia melhor avaliar comportamento alimentar pela administração de álcool.

Também mostramos que os ratos dos grupos ALC e ALCTAB ganharam duas vezes mais peso que os ratos dos grupos CTR ou TAB, indicando que o álcool foi o

responsável pelo aumento do aporte calórico e deposição do mesmo na forma de gordura. O álcool apresenta valor calórico de 7 kcal por g e seria natural de se esperar que sua ingestão estivesse associada a ganho de peso corporal, comumente observado em seres humanos (Levine et al., 2000). De fato, o consumo moderado de álcool pode aumentar o armazenamento de gordura, especialmente em indivíduos com sobrepeso, especialmente entre mulheres (Lands, 1993; Colditz et al., 1991). Diferente do esperado, não observamos perda de peso nos animais do grupo TAB, possivelmente porque esses animais ingeriam mais alimento que o grupo CTR. Em camundongos expostos à fumaça do cigarro por 3 dias se observou redução do comportamento alimentar, atribuído ao possível efeito anorexígeno da nicotina no centro da fome (Chen et al., 2005). Em seres humanos, estudos mostram que fumar aumenta a atividade adrenérgica, associada à redução do apetite, e promove termogênese, com consequente perda de peso (Pisinger e Jorgensen, 2007). É possível que o tempo de exposição e o número de cigarros/dia sejam determinantes para o aparecimento desses efeitos, não descartando diferentes vias de controle do apetite entre ratos e seres humanos.

Com relação à ingestão hídrica, o maior consumo de água no início do experimento, para os grupos ALC e ALCTAB, pode ser justificado pela inibição do hormônio anti-diurético pelo álcool (Patterson-Buckendahl et al., 2005). Estudo recente, conduzido em ratos comprovou o efeito do álcool sobre a aldosterona no controle do balanço hídrico. Porém, ao contrário do esperado, aqueles autores observaram redução da ingestão hídrica dos ratos (Barrero et al., 2012). Tal resultado foi justificado pelo fato de o álcool ter sido administrado na água de beber, tornando-a pouco palatável e inibindo sua ingestão (Barrero et al., 2012). Aqui, mostramos que o álcool aumenta a ingestão hídrica, possivelmente por mecanismos relacionados à aldosterona. No entanto, observamos

tolerância a esses efeitos, uma vez que, após a terceira semana, esse efeito já não mais foi percebido.

Curiosamente, a associação entre álcool e fumaça do cigarro manteve o consumo de água elevado ao longo do experimento. Embora sejam escassos os estudos avaliando variações de ingestão hídrica em animais, alguns mostram que o carbacol, um agonista de receptores muscarínicos e nicotínicos, aumenta a ingestão hídrica em roedores (Saad et al., 1985). Aqui não observamos aumento do comportamento hídrico em ratos expostos apenas à fumaça do cigarro (grupo TAB), mas sim, quando esta era associada ao álcool. Embora mais estudos sejam necessários para elucidar esse aspecto, podemos inferir que a associação com o cigarro foi determinante para redução dos mecanismos de tolerância do álcool ao controle da ingestão hídrica por sensibilização de receptores nicotínicos, sabidamente envolvidos no controle do comportamento de ingestão hídrica ou por sensibilização do sistema aldosterona.

6.5 Parâmetros bioquímicos

Com respeito à glicemia, nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois estudos mostram que tanto álcool quanto tabaco aumentam a glicemia. É sabido que, dentre as complicações pelo uso crônico de álcool, está o *Diabete mellitus* (DM) (Hodge et al., 2007). De fato, o álcool é um fator de risco para hiperglicemia, independentemente do DM, pois perturba a homeostasia da glicose, estando associado ao desenvolvimento de resistência à insulina (Wannamethee et al., 2002). Contudo, a frequência de uso e a dose de álcool parecem ser determinantes para alteração da glicemia. Isso foi observado por Cullmann e colaboradores (2012), que evidenciaram que o consumo crônico moderado de bebidas alcoólicas reduz o risco de pré-diabetes e DM entre seres humanos, enquanto usuários pesados aumentam esse risco. Outros estudos revelam que fumantes apresentam

maior risco de desenvolvimento de DM, e o risco está aumentado de acordo com o número de cigarros fumados por dia (Rimm et al. 1993). Não há estudos avaliando o efeito da associação do álcool e do cigarro. Nossos resultados indicam essa associação pode ser ainda mais importante para a elevação da glicemia (\uparrow 13%), o que poderia aumentar ainda mais o risco de desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes.

Porém, com relação ao perfil lipídico, nossos resultados são intrigantes em alguns aspectos. Com relação ao álcool, encontramos um aumento nos triglicerídeos pela administração diária, sem afetar o colesterol total e o HDL dos ratos. Estudos, em coelhos ou ratos, mostram aumento tanto de triglicerídeos, quanto do colesterol total e do HDL (Ikemura et al., 1992; Adaramoye e Oloyede., 2012). Contudo, as doses administradas e o tempo de tratamento são diferentes daqueles utilizados aqui. Enquanto coelhos foram tratados com 15 ou 15 e 30 mg/kg/dia, por 4 semanas, os ratos foram submetidos à administração de 2 g/kg, três vezes por semana, por 3 semanas. Doses diárias de 2g/kg, administradas duas vezes ao dia, por 30 dias, afetaram apenas os triglicerídeos.

Igualmente intrigante, a exposição à fumaça do cigarro mostrou uma diminuição dos triglicerídeos, colesterol total e HDL em ratos, sendo que a literatura mostra que fumar aumenta os níveis de colesterol total e triglicerídeo, além de diminuir HDL (Glueck et al., 1981; Croft et al., 1987). Não descartamos que a resposta observada nos animais possa ser diferente daquela observada em seres humanos. Para a associação entre álcool e cigarro, os poucos estudos conduzidos mostram não haver afetação do HDL, mas, ainda assim, os triglicerídeos estão aumentados (Glueck et al., 1981).

Para os demais parâmetros bioquímicos, o resultado que mais chama a atenção é o aumento da GGT no grupo associação ALCTAB. Conforme já mencionado, os níveis de GGT podem estar elevados não somente no alcoolismo crônico, mas também em infarto agudo do miocárdio, insuficiência renal, doença pulmonar obstrutiva crônica e diabetes

(Goldberg e Martin, 1975). Sendo álcool e cigarro, drogas de abuso potencialmente nocivas à saúde e estando relacionadas a obesidade, hipertensão, diabetes e outras síndromes metabólicas, podemos inferir que o grupo associação ALCTAB tenha um maior risco a apresentar alguma das patologias descritas.

Durante a revisão da literatura nos chamou realmente a atenção que há poucos estudos avaliando os efeitos da associação entre álcool e tabaco, apesar da espantosa proporção de indivíduos que usam essas duas drogas de abuso de abuso concomitantemente. Como já mencionado, a Organização Mundial da Saúde mostra que o uso abusivo de álcool é responsável por mais de 2,5 milhões de mortes anualmente, enquanto o tabaco é responsável por cerca de 6 milhões de mortes por ano. Os poucos modelos que consideram a associação entre álcool e cigarro, o fazem pela associação entre álcool e nicotina, ignorando as outras substâncias nocivas também presentes no fumo. No entanto, as mortes relacionadas ao cigarro estão importantemente ligadas à exposição do organismo a outras substâncias presentes na fumaça do cigarro e inaladas pela queima da folha de tabaco. Ainda há muito a explorar utilizando esse mesmo modelo de associação entre álcool e fumaça do cigarro.

7 Conclusão

Nosso principal objetivo aqui foi avaliar o efeito da associação entre álcool e a fumaça de cigarro sobre a proliferação celular hipocampal e memória de ratos. Com base nos nossos resultados, podemos concluir que a exposição concomitante ao álcool e ao cigarro apresenta efeito aditivo, inibindo a proliferação celular, de modo ainda mais importante do que o uso isolado dessas drogas. Todavia, não observamos alteração na memória de trabalho ou de longo prazo, possivelmente relacionada à exposição de doses

moderadas de álcool ou exposição à fumaça de pouco cigarros por dia. Não descartamos, contudo, que um tempo maior de exposição possa afetar esses parâmetros.

Embora não tenha sido objetivo principal, também observamos que a associação entre álcool e cigarro aumentou a ingestão hídrica, persistindo mesmo após 4 semanas de tratamento. Mais estudos são necessários para avaliar os efeitos dessa associação sobre mecanismo de sensibilização envolvido no controle da sede que desapareceram com o uso continuado do álcool.

8. Referências

1. Abreu-Villaça Y, de Carvalho Graça AC, Ribeiro-Carvalho A, de Freitas Naiff V, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nicotine Tob Res.* 2012 [Epub ahead of print].
2. Abreu-Villaça Y, Medeiros AH, Lima CS, Faria FP, Filgueiras CC, Manhães AC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. *Behav Brain Res.* 2007; 181(1):136-46.
3. Abrous DN, Adriani W, Montaron MF, Aurousseau C, Rougon G, Le Moal M, Piazza PV. Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci.* 2002; 22:3656–62.
4. Adaramoye OA, Oloyede GK. Effect of moderate ethanol administration on biochemical indices in streptozotocin-diabetic Wistar rats. *West Indian Med J.* 2012; 61(1):3-9.
5. Akker LV. Hormonal changes and biologically active substances in alcoholic women in the reproductive age. *AkushGinekol (Mosk).* 1991; 10:50–2.
6. Alkerwi A, Boutsen M, Vaillant M, Barre J, Lair ML, Albert A, Guillaume M, Dramaix M. Alcohol consumption and the prevalence of metabolic syndrome: a meta-analysis of observational studies. *Atherosclerosis.* 2009; 204(2):624-35.
7. Anderson ML, Nokia MS, Govindaraju KP, Shors TJ. Moderate drinking? Alcohol consumption significantly decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Neuroscience.* 2012; 224:202-9.
8. Attvall S, Fowelin J, Lager I, Von Schenck H, Smith U. Smoking induces insulin resistance—a potential link with the insulin resistance syndrome. *J Intern Med.* 1993;

233:327-32.

9. Balhara YP. Tobacco and metabolic syndrome. *Indian J EndocrinolMetab.* 2012; 16(1):81-7.
10. Bammer G, Chesher GB. An analysis of some effects of ethanol on performance in a passive avoidance task. *Psychopharmacology (Berl).* 1982; 77(1):66-73.
11. Barrero MJ, Ojeda ML, Díaz Castro J, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. The effects of ethanol upon hydric balance and arterial pressure in rats: Folic acid as a possible hypotensor. *Life Sci.* 2012; 90(9-10):337-42.
12. Berry RB, Matthews DB. Acute ethanol administration selectively impairs spatial memory in C57BL/6J mice. *Alcohol.* 2004; 32:9–18.
13. Bizarro L, Patel S, Stolerman IP. Comprehensive deficits in performance of an attentional task produced by co-administering alcohol and nicotine to rats. *Drug Alcohol Depend.* 2003; 72(3):287-95.
14. Brinton EA. Effects of ethanol intake on lipoproteins and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology.* 2010; 21(4):346–351.
15. Bronchal S, Nain CK, Prasad KK, Nada R, Sharma AK, Sinha SK, Singh K. Functional and morphological alterations in small intestine mucosa of chronic alcoholics. *J GastroenterolHepatol.* 2008; 23(2):43-8.
16. Bunout D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism. Their relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition.* 1999; 15 (7–8): 583–89.
17. Cahill PA, Redmond EM. Alcohol and cardiovascular disease--modulation of vascular cell function. *Nutrients.* 2012;4(4):297-318
18. Chan TC, Wall RA, Sutter MC. Chronic ethanol consumption, stress, and hypertension. *Hypertension.* 1985; 7:519–24.
19. Chan-Yeung M, Ferreira P, Frohlich J, Schulzer M, Tan F. The effects of age,

- smoking and alcohol on routine laboratory tests. *Am J ClinPathol.* 1981; 75(3): 320-6.
20. Chen H, Vlahos R, Bozinovski S, Jones J, Anderson GP, Morris MJ. Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain neuropeptide Y in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2005; 30(4):713-9.
 21. Chen W-JA, Parnell SE, West JR. Nicotine decreases blood alcohol concentration in neonatal rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 2001; 25:1072–7.
 22. Cohen JA, Kaplan MM. The SGOT/SGPT ratio-an indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci.*1979; 24:835–8.
 23. Colditz GA, Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Gordis E , Willet W. Alcohol intake in relation to diet and obesity in women and men. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54: 49-55
 24. Croft JB, Freedman DS, Cresanta JL, Srinivasan SR, Burke GL, Hunter SM, Webber LS, Smoak CG, Berenson GS. Adverse influences of alcohol, tobacco, and oral contraceptive use on cardiovascular risk factors during transition to adulthood. *Am J Epidemiol.* 1987;126(2):202-13.
 25. Crooks PA, Dwoskin LP. Contribution of CNS nicotine metabolites to the neuropharmacological effects of nicotine and tobacco smoking. *BiochemPharmacol.* 1997; 54(7):743-53.
 26. Cullmann M, Hilding A, Östenson CG. Alcohol consumption and risk of pre-diabetes and type 2 diabetes development in a Swedish population. *Diabet Med.* 2012; 29(4):441-52.
 27. Dancygier H, Seitz HK, Mueller S. *Alcoholic Liver Disease.* Berlin, Germany: Springer; 2010.
 28. Das SK, Varadhan S, Dhanya L, Mukherjee S, Vasudevan DM. Effects of chronic

- ethanol exposure on renal function tests and oxidative stress in kidney. *Indian J ClinBiochem.* 2008; 23(4):341-4.
29. Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* 2007; 81:177-87.
 30. Dash PK, Moore AN, Kobori N, Runyan JD. Molecular activity underlying working memory. *Learn Mem.* 2007; 14(8):554-63.
 31. DiFranza JR, Guerrera MP. Alcoholism and smoking. *J Stud Alcohol .* 1990; 51:130-135.
 32. Falk DE, Yi HY, Hiller-Sturmhofel, S. An epidemiologic analysis of co-occurring alcohol and tobacco use and disorders: findings from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Alcohol Res Health.* 2006; 29 (3): 162–171.
 33. Ferrara CM, Kumar M, Nicklas B, McCrone S, Goldberg AP. Weight gain and adipose tissue metabolism after smoking cessation in women. *Int J ObesRelatMetabDisord.* 2001; 25(9):1.322-1.326.
 34. Frati AC, Iniestra F, Ariza CR. Acute effect of cigarette smoking on glucose tolerance and other cardiovascular risk factors. *Diabetes Care.* 1996; 19:112-8.
 35. Friedman TW, Robinson SR, Yelland GW. Impaired perceptual judgment at low blood alcohol concentrations. *Alcohol.* 2011; 45(7):711-8.
 36. GaldurózJC, Noto AR, Nappo SA, Carlini EA. Uso de drogas psicotrópicas no Brasil: pesquisa domiciliar envolvendo as 107 maiores cidades do país. *Rev. Latino-Am Enferm.* 2005; 13:888-95.
 37. García-Moreno LM, Cimadevilla JM. Acute and chronic ethanol intake: effects on spatial and non-spatial memory in rats. *Alcohol.* 2012; 46(8):757-62.
 38. Gigliotti A, Bessa MA. Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnósticos.

Rev Bras Psiquiatr. 2004; 26(supl I):S11-3.

39. Glueck CJ, Heiss G, Morrison JA, Khoury P, Moore M. Alcohol intake, cigarette smoking and plasma lipids and lipoproteins in 12-19-year-old children. *Circulation*. 1981; 64(3 Pt 2):III 48-56.
40. Goldberg DM, Martin JV. Role of gamma-glutamyltranspeptidase activity in the diagnosis of hepatobiliary disease. *Digestion*. 1975; 12:232-46.
41. Gould TJ, Higgins SJ. Nicotine enhances contextual fear conditioning in C57BL/6J mice at 1 and 7 days post-training. *Neurobiol Learn Mem*. 2003; 80:147-57.
42. Greenstein JE, Kassel JD, Wardle MC, Veilleux JC, Evatt DP, Heinz AJ, Roesch LL, Braun AR, Yates MC. The separate and combined effects of nicotine and alcohol on working memory capacity in non-abstinent smokers. *ExpClinPsychopharmacol*. 2010; 18(2):120-8.
43. Gritz ER, Ippoliti A, Jarvik ME, Rose JE, Shiffman S, Harrison A, Van Vunakis H. The effect of nicotine on the delay of gastric emptying. *Aliment PharmacolTher*. 1988; 2(2):173-8.
44. Gulick D, Gould TJ. Interactive effects of ethanol and nicotine on learning in C57BL/6J mice depend on both dose and duration of treatment. *Psychopharmacology*. 2008; 196:483-495.
45. Guyton AC e Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica - 12ª Ed.* Rio de Janeiro. Elsevier. 2011.
46. Hahn B, Shoaib M, Stolerman I. Nicotine-induced enhancement of attention in the five-choice serial reaction time task: the influence of task demands. *Psychopharmacology*. 2002; 162(2):129-37.
47. Haroutunian V, Barnes E, Davis KL. Cholinergic modulation of memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985; 87(3):266-71.

48. Hätönen KA, Virtamo J, Eriksson JG, Perälä MM, Sinkko HK, Leiviskä J, Valsta LM. Modifying effects of alcohol on the postprandial glucose and insulin responses in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96(1):44-9.
49. Heishman SJ, Kleykamp BA, Singleton EG. Meta-analysis of the acute effects of nicotine and smoking on human performance. *Psychopharmacol Berl.* 2010; 210:453–469.
50. Hodge AM, English DR, O'Dea K, Sinclair AJ, Makrides M, Gibson RA, Giles GG. Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(1):189-97
51. Hoffman RS, Goldfrank LR. Ethanol-associated metabolic disorders. *Emerg Med Clin North Am.* 1989; 7:943–961.
52. Hoffmann SE, Matthews DB. Ethanol-induced impairments in spatial working memory are not due to deficits in learning. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001; 25:856–861.
53. Horowitz M, Maddox AF, Wishart JM, Shearman DJ. Cigarette smoking and rate of gastric emptying: effect on alcohol absorption. *Brit Med J.* 1991; 302:20–3.
54. Hurley LL, Taylor RE, Tizabi Y. Positive and negative effects of alcohol and nicotine and their interactions: a mechanistic review. *Neurotox Res.* 2012; 21(1):57-69.
55. Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Iwasaki K, Yamaguchi R, Zhao G, Iwamoto Y. Lipid metabolism abnormalities in alcohol-treated rabbits: a morphometric and haematologic study comparing high and low alcohol doses. *Int J Exp Pathol.* 2011; 92(4):290-5.
56. Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza M M, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 1998; 393:635–636.
57. Izquierdo I, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Szapiro G, Coitinho AS, Muller

- L, Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH. Memoryretrievaland its lastingconsequences. *Neurotox Res.* 2002; 4(5-6):573-593.
58. Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, Kim EH, Kim CJ. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport.* 2002; 13(12):1509-13.
59. Jessor R. Successful adolescent development among youth in high-risk settings. *Am Psychol.* 1993; 48(2):117-126.
60. Jobim PF, Pedroso TR, Werenicz A, Christoff RR, Maurmann N, Reolon GK, Schröder N, Roesler R. Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. *Behav Brain Res.* 2012; 228(1):151-8.
61. John U, Meyer C, Rumpf HJ, Schumann A, Thyrian JR, Hapke U. Strength of the relationship between tobacco smoking, nicotine dependence and the severity of alcohol dependence syndrome criteria in a population-based sample. *Alcohol.* 2003; 38:606-12.
62. Kenney JW, Gould TJ. Nicotine enhances context learning but not context-shock associative learning. *BehavNeurosci.* 2008; 122:1158–1165.
63. Kleykamp BA, Jennings JM, Eissenberg T. Effects of transdermal nicotine and concurrent smoking on cognitive performance in tobacco-abstinent smokers. *ExpClinPsychopharmacol.* 2011; 19(1):75-84.
64. Koelega HS. Alcohol and vigilance performance: a review. *Psychopharmacology (Berl).* 1995;118(3):233-49
65. Lands WEM, Zakhari S. The case of missing calories. *Am J ClinNutr.* 1991; 54(1):47-8.
66. Lands WEM. A summary of the workshop “Alcohol and calories: a matter of

balance". J Nutr. 1993; 123: 1338-1341.

67. Laranjeira R. I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira (endereço na internet). Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007. (atualizado em: 11/2007; Disponível em: http://www.senad.gov.br/relatorio_padrones_consumo_alcool.Pdf.(Acessado em: 24/01/2010).
68. Leitz JR, Morgan CJ, Bisby JA, Rendell PG, Curran HV. Global impairment of prospective memory following acute alcohol. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 205(3):379-87.
69. Levine JA, Harris MM, Morgan MY. Energy expenditure in chronic alcohol abuse. *Eur J Clin Invest*. 2000; 30:779–86.
70. Lieber, CS. Perspectives: do alcohol calories count?. *Am J Clin Nutr*. 1991; 54:976-82.
71. Limdi JK, Hyde GM. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J*. 2003; 79(932):307-12.
72. Little HJ. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol Res Health*. 2000; 24:215–24.
73. Majumdar SK, Shaw GK, O’Gorman P, Thomson AD. Plasma urea and creatinine status in chronic alcoholics. *Drug Alcohol Depend*. 1982; 9(2): 97-100.
74. Mandell W, Eaton WW, Anthony JC, Garrison R. Alcoholism and occupations: a review and analysis of 104 occupations. *Alcohol Clin Exp Res*. 1992; 16(4):734-746.
75. Maniam J, Morris MJ. The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology*. 2012;63(1):97-110.
76. Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, Craig CR, Collins AC, Damaj MI, Donny EC, Gardiner PS, Grady SR, Heberlein U, Leonard SS, Levin ED, Lukas RJ, Markou A, Marks MJ, McCallum SE, Parameswaran N, Perkins KA, Picciotto MR, Quik M, Rose JE, Rothenfluh A,

- Schafer WR, Stolerman IP, Tyndale RF, Wehner JM, Zirger JM. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007; 190(3):269-319.
77. Mechtcheriakov S, Brenneis C, Egger K, Koppelstaetter F, Schocke M, Marksteiner J. A widespread distinct pattern of cerebral atrophy in patients with alcohol addiction revealed by voxel-based morphometry. *J NeurolNeurosurg Psychiatry*. 2007; 78(6):610-4.
78. Ministério da Saúde, 2003. Acesso em 28/02/2013: http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicações/controlado_tabagismo.pdf
79. Moffatt RJ, Stamford BA, Biggerstaff KD. Influence of worksite environmental tobacco smoke on serum lipoprotein profiles of female nonsmokers. *Metabolism*. 1995; 44(12):1536-9.
80. Moncada D, Viola H. Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *J Neurosci*. 2007; 27(28):7476-81.
81. Neiman J. Alcohol as a risk factor for brain damage: neurologic aspects. *Alcohol ClinExp Res*. 1998; 22:346S-51S.
82. Nixon K, Crews FT. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurochem*. 2002; 83 (5), 1087–1093.
83. Nixon K, Crews FT. Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *J Neurosci*. 2004; 24(43):9714-22.
84. Oga S, Ferreira Galvão J, Moraes Moreau RL. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Ateneu. 2003; p.297-305.
85. OMS - Organização Mundial da Saúde. 2010. Draft Global Strategy to Reduce The

Harmful Use Of Alcohol. Acesso: http://www.who.int/substance_abuse/activities/gsrhua/en/index.html. Acessado em 28/02/2013.

86. OMS - Organização Mundial da Saúde, 2012. Global Information System on Alcohol/Tobacco and Health. <http://www.who.int/research/en/>. Acessado em 07/01/2013.
87. Palatini P, Casiglia E, Pauletto P, Staessen J, Kaciroti N, Julius S. Relationship of tachycardia with high blood pressure and metabolic abnormalities: A study with mixture analysis in three populations. *Hypertension*. 1997; 30:1267-73.
88. Panza F, Frisardi V, Seripa D, Logroscino G, Santamato A, Scafato E, Pilotto A, Solfrizzi V. Alcohol consumption in mild cognitive impairment and dementia: harmful or neuroprotective? *Int J Geriatr Psychiatry*. 2012; 27(12):1218-38.
89. Patterson-Buckendahl P, Kubovcaková L, Krizanová O, Pohorecký LA, Kvetnanský R. Ethanol consumption increases rat stress hormones and adrenomedullary gene expression. *Alcohol*. 2005; 37:157–66.
90. Pereira RSC, Hasimoto CN, Pelafsky L, Llanos JC, Cataneo DC, Spadella CT, Minossi JG. Intestinal Healing in Rats Submitted to Ethanol Ingestion. *Acta Cir Bras*. 2012; 27(3):236-43.
91. Piazza FV, Pinto GV, Trott G, Marcuzzo S, Gomez R, Fernandes Mda C. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behav Brain Res*. 2011; 2;217(1):16-20.
92. Pisinger C, Jorgensen T. Waist circumference and weight following smoking cessation in a general population: the Inter99 study. *Prev Med*. 2007; 44(4):290-5.
93. Pomerleau CS, Aubin HJ, Pomerleau OF. Self-reported alcohol use patterns in a sample of male and female heavy smokers. *J Addict Dis*. 1997;16(3):19-24.
94. Puma C, Deschaux O, Molimard R, Bizot JC. Nicotine improves memory in an

- object recognition task in rats. *EurNeuropsychopharmacol.* 1999; 9(4):323-7.
95. Rahim A, Naveed AK. Effect of smoke on PAPP-A and lipid profile in normal rats. *J Pak Med Assoc.* 2011; 61(5):496-7.
 96. Ramachandran S, Xie L, Scott JA, Subramaniam S, Lal R. A Novel Role for ConnexinHemichannel in Oxidative Stress and Smoking-Induced Cell Injury. *PLoS One* 2007; 40:712-20.
 97. Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 82:297- 325.
 98. Rezvani AH, Levin ED. Nicotine-alcohol interactions and cognitive function in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2002; 72, 865–872.
 99. Rice AC, Bullock MR, Shelton KL. Chronic ethanol consumption transiently reduces adult neural progenitor cell proliferation. *Brain Res.* 2004; 1011(1):94-8.
 100. Rimm EB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE. Cigarette smoking and the risk ofdiabetes in women. 1993;83(2):211-4.
 101. Romberger DJ, Grant K. Alcohol consumption and smoking status: the role of smoking cessation. *Biomed Pharmacother.* 2004; 58(2):77-83.
 102. Room R. Smoking and drinking as complementary behaviours. *Biomed Pharmacother.* 2004; 58:111–115.
 103. Rose JE, Brauer LH, Behm FM, Cramblett M, Calkins K, Lawhon D. Interactions between nicotine and ethanol. *Nicotine Tob. Res.* 2004; 6, 133–144.
 104. Saad WA, Menani JV, Camargo LA, Abrão-Saad W. Interaction between cholinergic and adrenergic synapses of the rat subfornical organ and the thirst-inducing effect of angiotensin II. *Braz J Med Biol Res.* 1985; 18(1):37-46.
 105. Sanday L, Patti CL, Zanin KA, Fernandes-Santos L, Oliveira LC, Kameda SR, Tufik

- S, Frussa-Filho R. Ethanol-Induced Memory Impairment in a Discriminative Avoidance Task is State-Dependent. *Alcohol ClinExp Res.* 2013; 37 Suppl 1:E30-9.
106. Santos AC, Ebrahim S, Barros H. Alcohol intake, smoking, sleeping hours, physical activity and the metabolic syndrome. *Prev Med.* 2007; 44(4):328-34.
107. Satyapal US, Kadam VJ, Ghosh R. Hepatoprotective activity of livobond a polyherbal formulation against CCl₄ induced hepatotoxicity in rats. *Int JPharmacol.* 2008; 4(6):472–476.
108. Sauls JS, Cowan N, Sher KJ, Moreno MV. Differential effects of alcohol on working memory: distinguishing multiple processes. *ExpClinPsychopharmacol.* 2007; 15(6):576-87.
109. Scerri C, Stewart CA, Breen KC, Balfour DJ. The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 2006; 184(3-4):540-6.
110. Seth D, Haber PS, Syn WK, Diehl AM, Day CP. Pathogenesis of alcohol-induced liver disease: classical concepts and recent advances. *J GastroenterolHepatol.* 2011; 26(7):1089-105
111. Shors TJ, Anderson ML, Curlik DM 2nd, Nokia MS. Use it or lose it: how neurogenesis keeps the brain fit for learning. *Behav Brain Res.* 2012; 227(2):450-8.
112. Sinforiani E, Zucchella C, Pasotti C, Casoni F, Bini P, Costa A. The effects of alcohol on cognition in the elderly: from protection to neurodegeneration. *Funct Neurol.* 2011; 26(2):103-106
113. SISP – Serviço de informações sobre substâncias Psicoativas. Acesso em 28/02/2013: <http://psicoativas.ufcspa.edu.br/>
114. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;82(3):171-7.

115. Sucov A, Woolard RH. Ethanol-associated hypoglycemia is uncommon. *AcadEmerg Med.* 1995; 2:185–199.
116. Tarantino AB. *Doenças Pulmonares.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982.
117. Thurman RG, Bradford BU, Iimuro Y, Frankenberg MV, Knecht KT, Connor H D, Adachi Y, Wall C, Arteel GE, Raieigh JA, Forman DT, Mason RP. Mechanisms of ethanol-induced hepatotoxicity: studies in rats. *Frontiers in Bioscience.* 1999; 4:42–46.
118. Tomson J, Lip GYH. Alcohol and hypertension: an old relationship revisited. *Alcohol.* 2005; 41:3–4.
119. Tylicki L, Puttinger H, Rutkowski P, Rutkowski B, Horl WH. Smoking as a risk factor for renal injury in essential hypertension. *Nephron ClinPract.* 2006; 103(4).
120. Wannamethee SG, Shaper AG, Perry IJ, Alberti KG. Alcohol consumption and the incidence of type II diabetes. *J Epidemiol Community Health.* 2002; 56:542-8.
121. Wei Z, Belal C, Tu W, Chigurupati S, Ameli NJ, Lu Y, Chan SL. Chronic nicotine administration impairs activation of cyclic AMP-response element binding protein and survival of newborn cells in the dentate gyrus. *Stem Cells Dev.* 2012; 10;21(3):411-22.
122. Whig J, Singh CB, Soni GL, Bansal AK. Serum lipids and lipoprotein profiles of cigarette smokers and passive smokers. *Indian J Med Res.* 1992; 96:282-7.
123. York JL, Hirsch JA. Application of bioelectric impedance methodology and prediction equations to determine the volume of distribution for ethanol. *Alcohol.* 1995; 12(6):553-8.
124. Zaslow MJ, Takanishi R. Priorities for research on adolescent development.1. *American Psychologist.* 1993; 48(2):185-192.
- 125.

9. ANEXO 1



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

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética Na Utilização De Animais

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:

Número: 19566

Título: Efeito da associação de álcool e cigarro sobre parâmetros de estresse em áreas cerebrais, neurogênese e comportamento de ratos

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ROSANE GOMEZ - coordenador desde 05/11/2010

MARIA FLAVIA MARQUES RIBEIRO - pesquisador desde 05/11/2010

Equipe Externa:

Claudia Ramos Rhoden - pesquisador desde 05/11/2010

Marilda C Fernandes - pesquisador desde 05/11/2010

Graeme F Mason - pesquisador desde 05/11/2010

Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo em aspectos metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 22 de Novembro de 2010

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética