


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Marília Moraes Wallauer



**EFEITOS DO ETANOL E DO
TABACO NO CEREBELO DE RATOS
WISTAR**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2016

Marília Moraes Wallauer

**EFEITOS DO ETANOL E DO
TABACO NO CEREBELO DE RATOS
WISTAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dra. Marilda da Cruz Fernandes

Co-orientador: Dr. Lucas Silva Tortorelli

**Porto Alegre
2016**

Dedico este trabalho à minha eterna avó Leda (*in memoriam*),

por se orgulhar de mim na minha vida acadêmica

e por ter se dedicado a mim com muito amor.

Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

É com grande alegria que escrevo estes agradecimentos como forma de carinho e apreço aos que, de alguma maneira, me ajudaram a concluir esta etapa importante em minha vida.

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, por atender minhas orações e me orientar a escolher o melhor caminho, mesmo quando tudo parecia dar errado ou não ter sido uma boa escolha.

A minha querida orientadora **Dra. Marilda da Cruz Fernandes**, por ser franca e acolhedora, me ensinando a lutar e perseverar. Obrigada pelos aprendizados que eu adquiri sob a tua orientação e que com certeza me fizeram crescer como pessoa e como estudante.

Em especial também ao meu Co-orientador **Lucas Tortorelli**, que me ajudou muito a concluir esta pesquisa com o seu conhecimento e paciência para me explicar e ajudar a desenvolver a dissertação.

Muito obrigada às técnicas do Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA, **Keli Cristine Reiter**, **Rosalva Meurer** e **Teresinha Stein**, especialmente a Rosalva, por passar todo o conhecimento durante os experimentos e pelas conversas.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Patologia, especialmente **Francine Rahmeier** e **Fernada Huf**, por prestarem a mim apoio e dedicação quando precisei, me ajudando a entender e a escrever este trabalho.

À secretária do PPG, **Maristela Pasin**, e a todos os professores da UFCSPA, que contribuíram para todo o conhecido adquirido e que levarei para a vida toda.

Gostaria de agradecer ao auxílio financeiro que recebi neste período através da bolsa e financiamento da minha pesquisa, concedidos pelas agências de fomento CNPq e CAPES.

Aos professores que dedicaram tempo e conhecimento nas aulas, palestras, jornada acadêmica, muitas vezes aconselhando e conversando para que eu pudesse desenvolver o que aprendi.

Aos meus amados pais, **Carlos Germano Wallauer** e **Vânia M^a Moraes Wallauer**, por dedicarem a vida as minhas escolhas e minha vida acadêmica. Obrigada por sempre me acompanhar e consolar, aconselhar e ouvir, abraçar e lutar junto comigo para que eu pudesse realizar mais um sonho. Meu querido irmão, **Carlos Germano Wallauer Filho**, que sempre expressou o seu amor e preocupação e minha avó **Erica Wallauer**.

Ao meu companheiro **Ricardo Gerhard**, que vem me acompanhando desde o início com muita paciência, sabedoria, carinho, amor e ajudando a vencer a cada dia. Mesmo com a distância, enfrentamos da melhor forma e hoje podemos comemorar juntos.

Aos meus amigos e familiares que não citei aqui, mas que sempre ouviram sobre o meu trabalho e que muitas vezes me aconselharam e torceram para que tudo ocorresse bem. Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O Cerebelo	3
1.2 Drogas lícitas de abuso	17
1.2.1 Álcool.....	17
1.2.2 Tabaco	21
1.2.3 Associação entre álcool e tabaco.....	23
1.3 Apoptose	25
1.4 Astroglia.....	28
1.4.1 GFAP.....	31
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
2 OBJETIVOS.....	39
3 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	40
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
5. ANEXOS.....	59
5.1 Análise digital das reações Imunohistoquímicas	59
5.1.1 Quantificação do GFAP	59
5.1.2 Contagem das células em apoptose	64
5.2 Termo de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa com animais.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ALC: Grupo álcool

ALCTAB: Grupo álcool + tabaco

CCG: Camada de células granulares

CG: Camada Granular

CGE: Camada germinal externa

CGI: Camada granular interna

CGNs: Neurônios granulares do cerebelo

CM: Camada Molecular

CCP: Camada de células de Purkinje

CGB: Células gliais de Bergmann

CP: Célula de Purkinje

CTR: Grupo controle

DC: Deconvolução de cor

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GATS: Questionário Global de Tabaco em Adultos

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Nach: Receptores colinérgicos nicotínicos

NACHRs: Receptores nicotínicos neuronais

nAChR: Receptores nicotínicos de acetilcolina

OMS: Organização Mundial de Saúde

SNC: Sistema Nervoso Central

SN: Sistema Nervoso

TAB: Grupo tabaco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração das células do sistema nervoso central.....	4
Figura 2: Ilustração do cérebro humano e cérebro do rato.....	6
Figura 3: Ilustração das células presentes no córtex cerebelar.....	8
Figura 4: Representação histológica com coloração cresil violeta do cerebelo do rato e do cerebelo humano.....	10
Figura 5: Exemplo de algumas conexões do cerebelo com o cérebro.....	16
Figura 6: Esquema do Processo de Astrogliose.....	30

RESUMO

Introdução: O etanol e o tabaco são drogas lícitas mais consumidas no mundo, mais de 90% dos indivíduos dependentes de álcool são tabagistas, e alcoolistas pesados fumam mais do que indivíduos não alcoolistas. A nicotina afeta o estado de alerta, relaxamento da musculatura, cognição e memória. Porém, o impacto da associação do álcool etílico e do tabaco sobre as células ainda não está bem elucidado. O cerebelo é um dos órgãos mais suscetíveis ao efeito do etanol durante o desenvolvimento, estando suscetível a apoptose celular. Entretanto, poucos estudos foram realizados em animais adultos. A visão tradicional do cerebelo, como um coordenador da função motora foi redefinido durante as últimas décadas, onde o seu papel tem ganhado mais atenção na modulação do processamento cognitivo e emocional. **Objetivo:** avaliar o índice apoptótico no córtex e substância branca cerebelar de ratos wistar adultos que inalaram fumaça de cigarro e ingeriram etanol 2x por dia durante 57 dias. **Metodologia:** estudo experimental, utilizando 32 ratos Wistar machos adultos separados em 4 grupos: Controle (CTR): recebeu solução glicosada por gavagem; Álcool (ALC): recebeu etanol em solução glicosada por gavagem; Tabaco (TAB): recebeu a mesma solução glicosada do grupo CTR, e exposto à fumaça da queima de 12 unidades/dia; Álcool + Tabaco (ALCTAB): recebeu a solução alcoólica como o grupo ALC e exposto à fumaça de cigarro como o grupo TAB. A avaliação foi feita por técnicas de imunohistoquímica para Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e Caspase-3 clivada. **Resultados:** Não houve diferença significativa entre os grupos na apoptose celular, mas a análise do GFAP mostrou uma diferença significativa no grupo ALCTAB comparado com os outros grupos. **Conclusões:** Concluimos que embora não tenhamos encontrado significância na morte celular, observamos um processo de astrogliose reativa associado ao aumento do GFAP no grupo que consumiu as drogas em associação.

Palavras-chave: Álcool, tabaco, cerebelo, apoptose, astrogliose

1 INTRODUÇÃO

O álcool e o tabaco são as drogas lícitas mais consumidas no mundo, mesmo com políticas públicas voltadas para a recuperação, combate e prevenção deste consumo. Segundo Meyerhoff e cols. (2006), mais de 90% da população que é dependente de álcool, é também tabagista, sendo que alcoolistas pesados fumam mais do que indivíduos tabagistas não alcoolistas.

O uso nocivo de álcool e tabaco está entre os três principais fatores de riscos para doenças adquiridas pelo abuso destas drogas lícitas, causando doença pulmonares, cardíaca e cânceres (Meyerhoff e cols., 2006; Lim e cols, 2012), bem como alterações importantes no Sistema nervoso central (SNC) (Abreu-Villaça e cols., 2013).

O tabagismo no Brasil, segundo a Questionário Global de Tabaco em Adultos (GATS), é o segundo fator de risco mais prevalente para a morte entre as doenças não transmissíveis, sendo responsável por 18% de todas as mortes causadas por diferentes tipos de câncer e 71% de todas as mortes causadas por câncer de pulmão. Esses riscos e patologias estão associados à exposição tecidual de mais de 4.000 diferentes compostos tóxicos, dentre eles algumas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, gerados durante a combustão da folha desta planta (INCA, 2010).

O consumo de álcool é mais provável de acontecer em indivíduos tabagistas do que em não tabagistas (Al-Rejaie e Dar, 2006). Porém, pouco se sabe sobre o que a exposição combinada de álcool e tabaco pode causar nos tecidos. Também foi sugerido que o consumo combinado de nicotina e álcool faz com que o combate a dependência seja mais difícil, pois estas substâncias compartilham uma ação comum sobre os receptores colinérgicos nicotínicos (Nach) (Yang e cols., 1999).

O álcool prejudica a função de neurônios e células gliais, interrompendo uma ampla gama de funções que incluem a sobrevivência neuronal, a migração neuronal e de células gliais (astrócitos e oligodendrócitos) e sua diferenciação (De la Monte e Kril, 2014). No cerebelo, os neurônios granulares passam pelo processo de apoptose em resposta a exposição ao álcool e a maioria dos estudos relata que as lesões cerebelares surgem por causa da exposição pré-natal ao álcool e principalmente durante a sinaptogenese (Thomas e cols., 2011; Luo, 2012;). Acredita-se que isso se correlaciona com o fato do cerebelo ser uma estrutura do encéfalo mais suscetível aos efeitos do etanol durante o desenvolvimento, induzindo a apoptose de seus principais neurônios: as células de Purkinje e as células granulares (Luo, 2012). No entanto, existem poucos estudos sobre os efeitos do etanol nas células do cerebelo em animais adultos.

Embora alguns estudos mostrem que o uso moderado do álcool apresenta efeito neuroprotetor e que a nicotina, um dos constituintes do cigarro, aumenta o desempenho cognitivo de usuários (Al-Rejaie e Dar, 2006; Meyerhoff e cols., 2006; Taslim e Dar, 2011), pouco se sabe sobre os efeitos da associação crônica de álcool e da fumaça do cigarro. Portanto, são necessários mais estudos para avaliação dos efeitos dessa associação sobre o SNC, refletindo a real condição humana de consumo dessas duas drogas de abuso.

1.1 O Cerebelo

Concordando com Reeber e cols. (2013), ao afirmar que:

“O cérebro humano, sem dúvida, a estrutura mais complicada na natureza, não é uma exceção à hipótese de que os padrões são inerentes a todas as formas, independentemente da sua simplicidade ou complexidade”,

podemos estudar um pouco de como esta estrutura funciona perante algumas adversidades (Reeber e cols., 2013).

O cerebelo é uma estrutura encontrada como parte do encéfalo que compõe parte do SNC (Bear e cols., 2002). O SN (sistema nervoso) é composto por células que são os neurônios e as células gliais, sendo os principais componentes do tecido nervoso. O neurônio é a célula nervosa excitável a qual recebe, processa e envia as informações. As células gliais do SNC são: astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células endoteliais (Gazzaniga e cols., 2006; Gartner e Hiatt, 2007).

Os astrócitos são células grandes e estreladas, circundam os neurônios e estão intimamente ligadas com a vascularização encefálica através dos pedículos, permitindo-lhes transportar íons através da parede vascular e assim criar a barreira hematoencefálica, que protege o SNC de agentes químicos presentes na circulação. As micróglia são células pequenas e irregulares que agem no tecido lesado fagocitando as células danificadas. Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação da bainha de mielina ao redor dos axônios. As células endoteliais revestem os ventrículos e são modificadas formando o epitélio dos plexos coróides. Possuem microvilos, pregas basais, mitocôndrias, zônulas de oclusão e lâmina basal que formam a barreira hematoencefálica. Transportam água, íons e proteínas e produzem o líquido cerebrospinal (Gazzaniga e cols., 2006; Gartner e Hiatt, 2007). Abaixo, ilustração das células presentes no SNC.

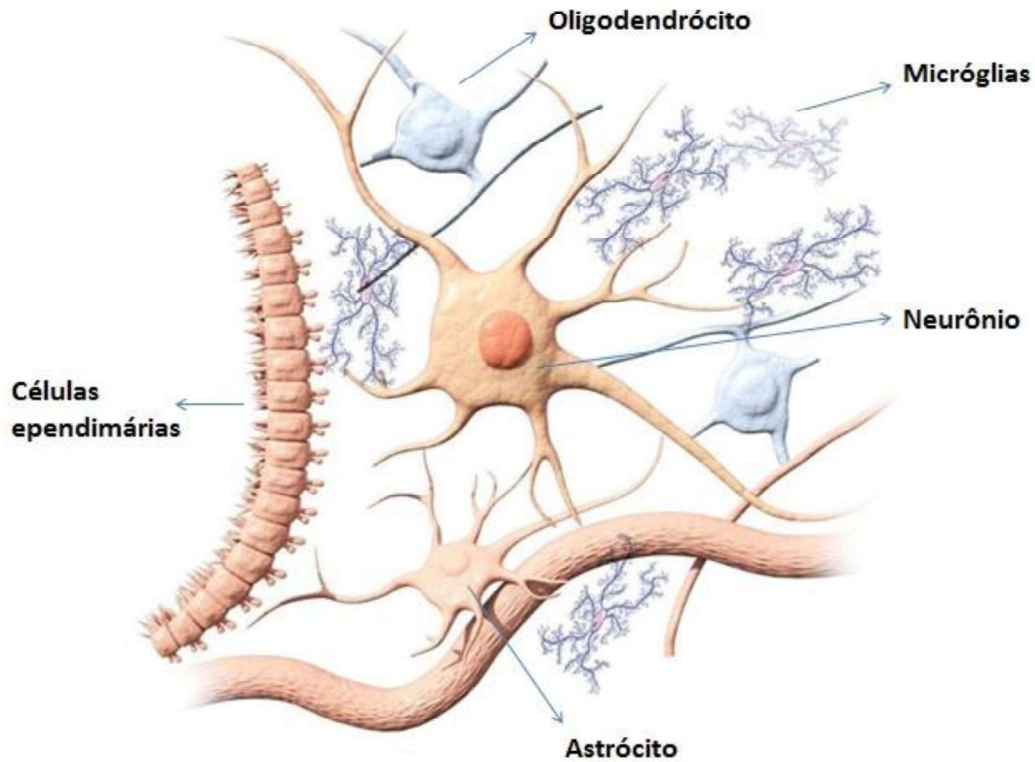


Fig. 1: Ilustração das células do SNC. Figura criada por Jonatan Sarmento:

Ilustrações.

Em meados do século XVI, Vesalius questionou estudos anatômicos sobre o cerebelo que foram realizados anteriormente, pois acreditavam que o cerebelo era uma proeminência da região occipital e que o tamanho da massa indicava o quanto as pessoas tinham talento e memória. Em 1573, Varolio descreveu e ilustrou a ponte, também conhecida como “Ponte de Varolio”, apontando com uma ligação importante com o cerebelo. A partir daí os estudos anatômicos se tornaram mais precisos, quando foram descritos os núcleos cerebelares, as fibras e suas ramificações (Glickstein e cols., 2009).

Posteriormente, no século XVIII, Malacarne publicou seu primeiro trabalho dedicado ao cerebelo, abordando minuciosamente o córtex cerebelar e suas subdivisões, bem como a variabilidade no número das folhas cerebelares. Após, Rail e Burdach

nomearam os lóbulos do cerebelo, aos quais continuam sendo utilizados até hoje. No início do século XIX, surgiram os primeiros estudos com animais para melhor compreensão das funções do cerebelo. Rolando observou que o cerebelo era responsável pelo início dos movimentos, porém seus experimentos eram com movimentos mais grosseiros. Porém, Flourens e Luciani mostraram que remover o cerebelo não tornava os movimentos totalmente perdidos, mas havia uma falta de coordenação e sincronia dos movimentos (Glickstein e cols., 2009).

Quando estudado mais especificadamente, Bolk e Larsell, já no século XIX, nomearam e numeraram os lóbulos do vérmis com estudos de localização e funcionalidade, abrindo novos caminhos para que Sultan e Braitenberg pudessem explorar as dimensões do cerebelo. Atualmente há uma gama de revisões a respeito do desenvolvimento da fisiologia do cerebelo e suas novas funções, evidenciando assim uma íntima ligação com outros componentes do cérebro (Glickstein e cols., 2009).

Podemos dizer que o cerebelo faz parte do sistema nervoso supra-segmentar, situando-se dorsalmente ao tronco encefálico e contribuindo para a formação do quarto ventrículo. Está sobre a fossa cerebelar do osso occipital, separado do lado occipital do cérebro por uma prega da dura mãe, chamada de tenda do cerebelo. Está conectado à medula e ao bulbo raquídeo através do pedúnculo cerebelar inferior e à ponte e ao mesencéfalo pelos pedúnculos cerebelares médio e superior, nesta ordem. O vérmis se distingue do cerebelo pois é considerado uma porção única que está ligado a duas grandes massas laterais, os hemisférios cerebelares (Machado, 2006; Martin, 2013; Roostaei e cols., 2014). Em seguida, uma ilustração anatômica do cérebro humano e do rato na Figura 2.

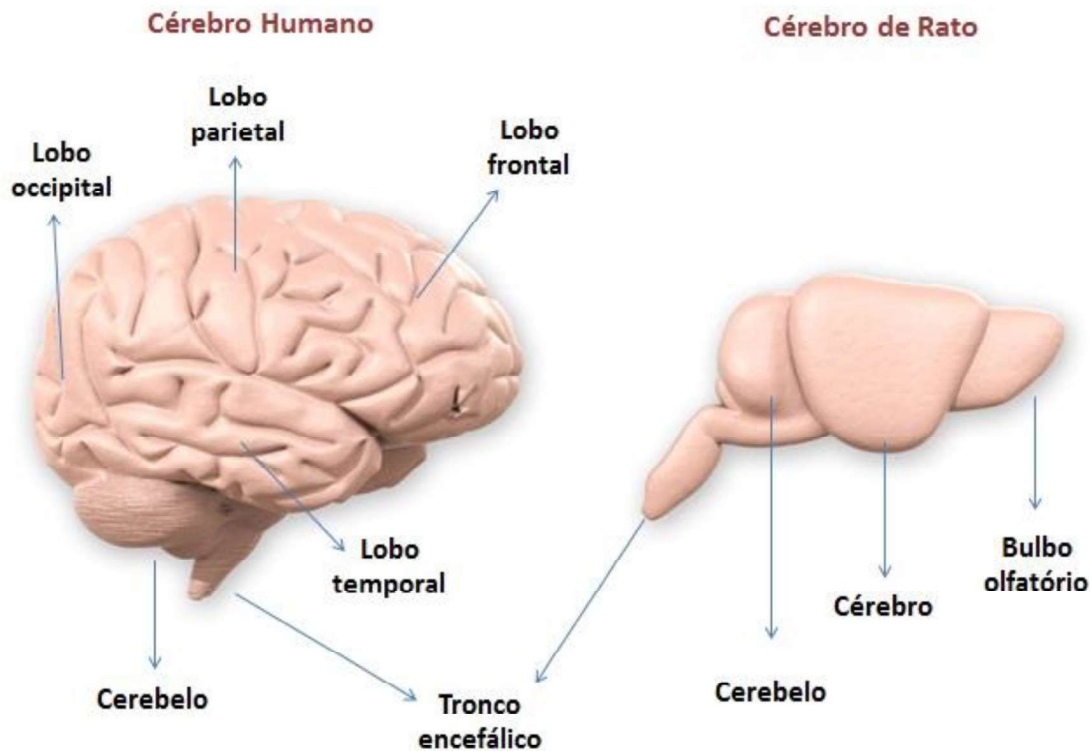


Fig. 2: Ilustração do cérebro humano e do rato. Figuras criadas por Jonatan Sarmento: Ilustrações.

A divisão ontogenética do cerebelo proposta por Larsell baseia-se principalmente na ontogênese do cerebelo, levando em consideração o fato de que a primeira fissura que aparece durante o desenvolvimento do órgão é a pósterolateral. Então, o cerebelo é dividido em duas partes desiguais: o lóbulo flóculo-nodular e o corpo do cerebelo. Deste modo, o cerebelo humano é formado por três partes: arquicerebelo, paleocerebelo e neocerebelo. O arquicerebelo diz respeito ao lóbulo flóculo-nodular, o paleocerebelo ao lobo anterior da pirâmide e a úvula, e o neocerebelo ao resto do lobo posterior (Schmahmann e Pandya, 1997; Roostaei e cols., 2014).

Ao olharmos macroscopicamente o cerebelo, identificamos em sua superfície os sulcos, predominantemente na direção transversal e que são delimitados pelas folhas do cerebelo. Também há os sulcos mais pronunciados, que são as fissuras do cerebelo e que

delimitam os lóbulos em suas subdivisões em 10 lóbulos transversais indicados por algarismos romanos (lóbulos I-X) e cada um deles pode conter várias folhas. Esta organização que é visível na superfície do cerebelo é particularmente evidente nas secções do órgão, revelando aspectos de como é a sua organização interna. Podemos ver então que o cerebelo é constituído de um centro de substância branca situada no corpo medular do cerebelo, por onde difundem as lâminas brancas do cerebelo, e que são revestidas externamente por uma fina camada de substância cinzenta que é o córtex cerebelar. Este corpo medular do cerebelo recebeu o nome de árvore da vida por apresentar um desenho semelhante a uma árvore e seus ramos quando visto em cortes sagitais. No interior do corpo medular do cerebelo existem quatro pares de núcleos de substância cinzenta, os núcleos centrais do cerebelo, denominados: denteado, emboliforme, globoso e fastigial (Roostaei e cols., 2014).

Ao analisarmos microscopicamente o cerebelo, é possível visualizar a sua citoarquitetura a qual é praticamente a mesma em todas as folhas e lóbulos. Esta possui três camadas: molecular, células de Purkinje e células granulares (Machado, 2006; Martin, 2013), ilustrada conforme figura 3. O cerebelo contém cerca de 80% do total neurônios do cérebro (Herculano-Houzel e cols., 2006; Herculano-Houzel 2010) e é composto por matrizes altamente regulares de unidades neuronais (Roostaei e cols., 2014).

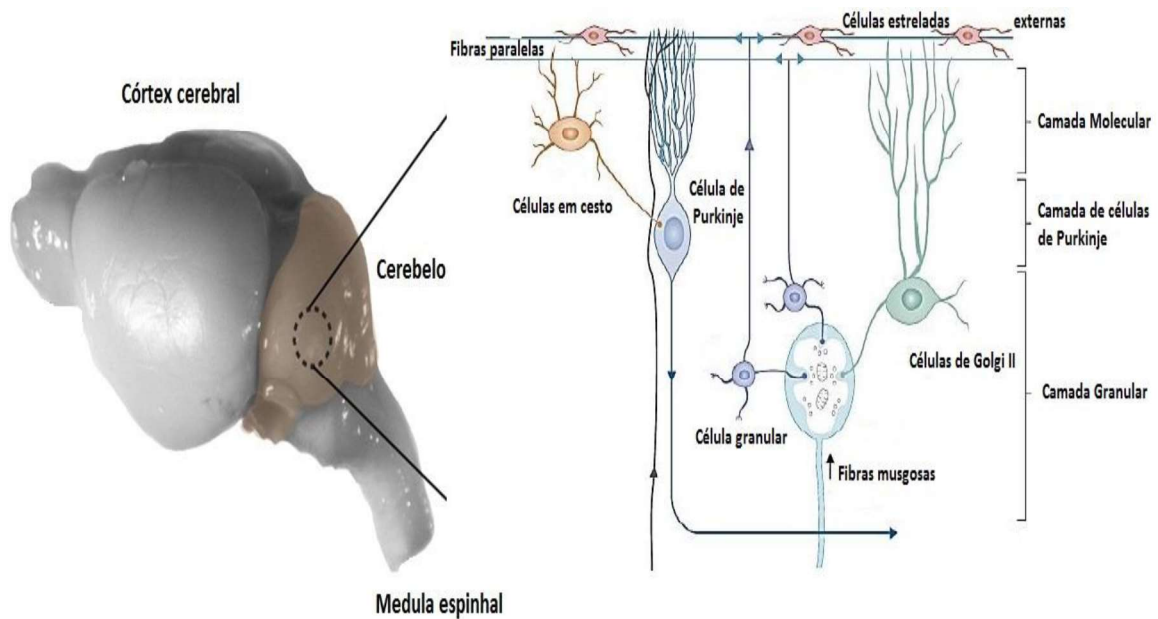


Fig. 3: Ilustração das células presentes no córtex cerebelar (figuras adaptadas de Constanzo, 2004; Reeber e cols., 2013).

A camada molecular (CM) possui principalmente fibras orientadas paralelamente contendo dois tipos de neurônios: as células estreladas e as células em cesto. As células em cesto estabelecem sinapses axossomáticas ao redor do corpo das células de Purkinje (CP) em forma de cesto que recebem sinapses excitatórias das fibras paralelas através dos espinhos dendríticos. As células estreladas projetam axônios para as CP adjacentes, recebendo sinais excitatórios das fibras paralelas e transmitindo sinais inibitórios para as CP (Albus, 1971; Fonnum e Lock, 2000; Machado, 2006;).

A camada média contém os elementos mais importantes do cerebelo, as CP (Reeber e cols., 2013). Essas são piriformes grandes e densas, possuem dendritos que se ramificam para a CM e um axônio que sai em direção oposta, terminando nos núcleos centrais do cerebelo e exercendo uma função inibitória. Além disso, os axônios das CP enviam correntes colaterais para outras CP, células em cesto, células estreladas, e células de Golgi (Albus, 1971; Fonnum e Lock, 2000; Machado, 2006;).

A camada granular (CG) constitui-se principalmente de células granulares ou grânulos do cerebelo, sendo células muito pequenas onde o citoplasma é reduzido. Cada célula da CM se desprende de um axônio e migra em direção à superfície do córtex. Quando esta atinge o axônio da CM, faz um ramo em forma de T longitudinalmente formando fibras paralelas. Estas fibras paralelas fazem contato sináptico excitatório com as CP, as células em cesto, as células estreladas, e as células de Golgi. As células granulares são ativadas pelas fibras musgosas provenientes de outras regiões do cérebro, exceto da Oliva inferior que ativa as CP através da fibra trepadeiras (Albus, 1971; Fonnum e Lock, 2000; Machado, 2006).

Além disso, a CM possui outro tipo de neurônio, as chamadas células de Golgi, as quais possuem ramificações bem amplas. São células menos numerosas do que as células granulares, mas possuem ampla propagação dendrítica que atinge a CM e são excitadas pelas fibras musgosas. Os seus ramos que atravessam a CG são capazes de inibir as células granulares (Albus, 1971; Fonnum e Lock, 2000; Machado, 2006). As camadas do cerebelo do Rato e Humano estão ilustrados na Figura 4.

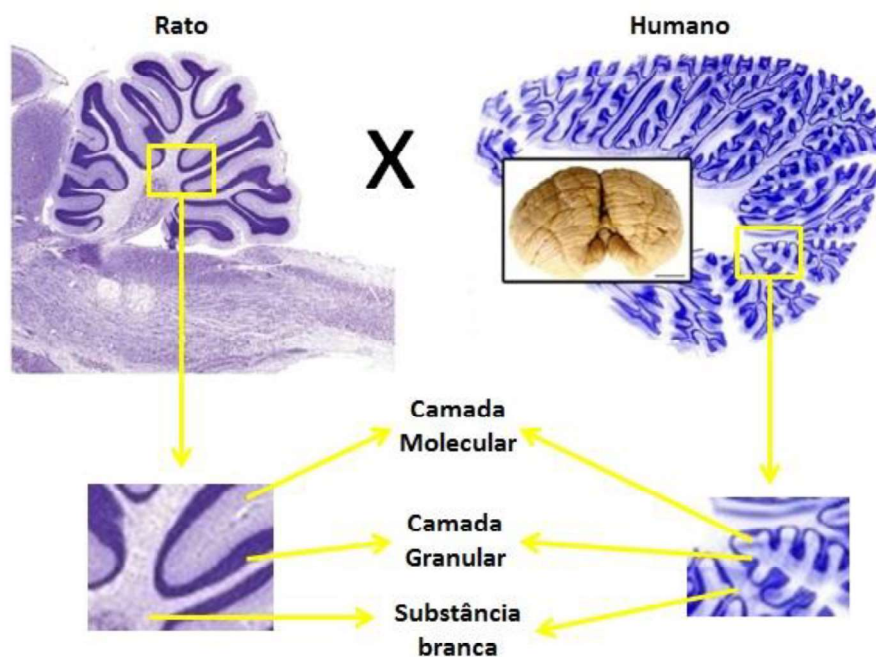


Fig. 4: Representação histológica com coloração cresil violeta do cerebelo do rato e do cerebelo humano. Imagem cerebelo rato de 1mm com zoom de 30% e Imagem cerebelo humano de 10mm com zoom de 30%. (imagens adaptadas de Baizer, 2014).

Ainda, podemos citar as fibras musgosas e as fibras trepadeiras. As fibras musgosas constituem um dos dois sistemas de fibra de aferência para o cerebelo. As informações de aferência são transmitidas ao cerebelo a partir de diferentes fibras. Algumas fibras musgosas levam informações a partir do sistema vestibular, da formação reticular, ou de ambos. Outras carregam a informação que vem a partir do córtex cerebral através da ponte. Tem sido estudado sobre o sistema das fibras musgosas atuarem em órgãos receptores dos músculos das articulações e da pele. Já, as fibras trepadeiras são o segundo tipo de fibras de aferência no cerebelo. São diferentes das fibras musgosas, pois cada uma das CP recebe uma única fibra trepadeira. São chamadas de fibras de trepadeiras porque o contato com a CP inicia na base da sua árvore dendrítica e escala o tronco da árvore, realizando potentes sinapses excitatórias (Albus, 1971; Machado, 2006).

Conforme Kiessling e cols. (2014), as células do cerebelo humano são geradas antes do nascimento por volta da 9ª semana de gestação e continua a sua formação durante o primeiro ano pós-natal. Os precursores das CP aparecem mais cedo durante o desenvolvimento embrionário, na zona ventricular do quarto ventrículo, onde se proliferam. A partir deste momento, as células precursoras migram radialmente para o seu destino final que é a camada de células de Purkinje (CCP), entre a 9ª e 10ª semana de gestação. A finalização do número de CP ocorre pela 13ª semana de gestação. Os precursores das células granulares migram a partir da zona subventricular dos lábios rômnicos durante a 10ª e 11ª semanas de gestação, onde se proliferam e formam a camada de células granulares externa. Em seguida, os precursores das células granulares migram radialmente no cerebelo ao longo das células gliais de Bergmann (CGB). Na 21ª semana de gestação se forma a camada de células granulares interna, abaixo da CCP, tornando-se visível durante a semana 27 ou 28 da gestação (Carlson, 2014).

Segundo Fonnum e Lock (2000), as CP em ratos são formados entre os dias 14-16 de gestação. Após o nascimento elas formam uma camada que tem aproximadamente seis células de espessura e pelos dias 3 e 4 (pós-natal) são transformadas numa única camada. A camada de células granulares (CCG) é formada a partir da camada germinal externa (CGE) entre os dias 7-15 (pós-natal) com um pico entre os dias 10 e 11 (pós-natal). As células em cesto e as células estreladas são formadas nos dias 6 e 7 e 10 e 11 dias (pós-natal) respectivamente. As células granulares migram a partir da CGE para a camada granular interna (CGI).

Também para Xifró e Rodríguez-Álvarez (2015), os progenitores dos neurônios dos grânulos do cerebelo (CGNs) surgem na fase pré-natal através dos lábios rômnicos, no limite do mesencéfalo e metencéfalo, formando assim a CGE. Em roedores, os neuroblastos da CGE proliferaram durante a primeira semana pós-natal. Já na segunda

semana pós-natal, os neurônios se diferenciam durante a sua migração através das camadas moleculares e de CP para atingir a maturidade na CGI até o final da terceira semana pós-natal. Durante a sua migração da CGE para o CGI, os CGNs que deixam de receber aferências excitatórias das fibras musgosas morrem por apoptose.

A gliogenese que ocorre no cerebelo, se dá juntamente com a gênese de células granulares e interneurônios. Pouco é compreendido sobre os fatores que desencadeiam e regulam a gliogenese. No cerebelo maduro de mamíferos, há três subtipos astrogliais que são distintos: astrócitos fibrosos na substância branca, astrócitos estrelados multipolares e astrócitos da glia radial, que vão desde os corpos de células na CCP através de toda a CM até a membrana basal abaixo da pia mãe (Leto, 2015).

Na revisão realizada por Zeeuw e Hoogland (2015), comentam que a função versátil dos astrócitos é bem evidenciada pelas células da glia de Bergmann (CGB) do cerebelo, capaz de ultrapassar a célula neuronal de eferência do córtex cerebelar, as CP. As CGB são essenciais para a migração correta de células granulares em desenvolvimento para a camada cerebelar precoce, bem como no circuito do cerebelo adulto, ajudando na homeostase dos íons. Também são importantes para a estabilidade sináptica, plasticidade, neuroproteção e função metabólica. Assim, as CGB detectam ambos os neurotransmissores, inibitórios e excitatórios. O cerebelo possui dois importantes neurotransmissores que são: o ácido-gama-amino-butírico (GABA) e o glutamato. O GABA tem função inibitória e está presente em todas as células do cerebelo, com exceção das células granulares, que tem o glutamato como neurotransmissor e possuem função excitatória no córtex cerebelar (Fonnum e Lock, 2000).

É evidente que existe uma ligação entre o cerebelo e o córtex cerebral, conforme Baizer (2014), menciona em seu artigo:

“A expansão do córtex cerebral e cerebelo são funcionalmente ligados: o cerebelo e córtex cerebral são altamente interligados. Tal como demonstrado em vários estudos, o cerebelo recebe entrada topograficamente organizada a partir de muitas regiões funcionais do córtex cerebral através de relês nos núcleos pontinhos” Baizer (2014).

Segundo Glickstein (2007):

“O cerebelo é provavelmente o único elo mais importante entre as áreas visuais e motoras do córtex cerebral” Glickstein (2007).

Inicialmente, acreditava-se que o cerebelo possuía apenas funções relacionadas ao controle motor, mas alguns pesquisadores notaram que o cerebelo é interligado com o cérebro principalmente através de dois circuitos polissinápticos, através de um canal de aferência de sinapses na ponte e por um outro canal de eferência que atravessa o cerebelo e se projeta aos núcleos cerebelares profundos passando pelo tálamo e finalmente atingindo o córtex cerebral. Portanto, viu-se que o cerebelo recebe e envia informações para regiões corticais pré-frontais envolvidas no controle não motor, áreas relacionadas com a cognição (Strick e cols., 2009; Bernard e cols., 2012; Buckner, 2013; Hoche e cols., 2015;).

Sabe-se que o cerebelo recebe impulsos de várias regiões do cérebro envolvidas na atividade motora, como da medula espinhal, do núcleo vestibular e do córtex cerebral (Fonnum e Lock, 2000). Também participa do controle das mãos e dos dedos, bem como do controle do movimentos dos olhos (Baizer, 2014). Além do envolvimento do cerebelo no controle de movimentos voluntários e relacionados com o ritmo, coordena os diferentes grupos musculares para executarem com naturalidade e precisão. O cerebelo também recebe um *feedback* contínuo do movimento que o indivíduo quer realizar e dos movimentos realizados, ou seja de ação em curso (Fonnum e Lock, 2000; Buckner, 2013;). O cerebelo não só desempenha um importante papel apenas nas previsões originadas de estímulos sensoriais, mas também nas previsões temporais (Smet e cols., 2013).

Estudos anatômicos realizados em primatas não-humanos e roedores, através de imagens, defendem que existe uma grande ligação mono e polissináptica do cerebelo com: o córtex cerebral, o hipocampo, a amígdala, o hipotálamo, a substância cinzenta periaquedutal, os núcleos da base, o tálamo, o tronco cerebral e a medula espinhal, mostrando que existe uma ligação com outras regiões. O tálamo é uma grande estação de retransmissão da entrada do cerebelo para o córtex e os núcleos pontinos são a principal forma de entrada do córtex cerebral para o cerebelo (Reeber, 2013).

Leggio e Molinari (2015), sugerem que o cerebelo tem uma função central, baseado na sua capacidade de gerar modelos internos, pois detecta e simula padrões repetitivos de eventos que envolvem tempo e espaço, podendo assim gerar modelos internos que podem ser usados para fazer previsões de eventos futuros. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que o cerebelo reconhece eventos em série, como uma sequência correta de eventos, sendo utilizado em computações neurais e como papel fundamental na condução motora, cognitiva e comportamental.

O sistema cérebro-cerebelar correlaciona vários papéis, incluindo ações motoras com condição de humor e motivação inconsciente, facilitando a comunicação não-verbal. Da mesma forma que o cerebelo regula a taxa, força, ritmo e precisão dos movimentos, ele também pode regular a velocidade, a capacidade, a consistência e a adequação dos processos mentais ou cognitivos (Schmahmann e Pandya, 1997). As ações diárias, que incluem atenção, processamento de informações, memória de trabalho, desempenho nos processos de aprendizagem, a linguagem, a navegação visoespacial, também estão relacionadas com o papel do cerebelo neste circuito cérebro-cerebelar (Bellebaum e Daum, 2007).

Pesquisas utilizando neuroimagem trouxeram novas descobertas para as funções do cerebelo, por exemplo, na revisão realizada por Bernard e cols. (2012), encontraram

estudos com os lóbulos do cerebelo através de imagens que apoiam a topografia funcional do cerebelo que, de acordo com a literatura está associado a tarefas, o sinal eferente é transmitido através do núcleo denteado para o córtex motor, pré-frontal e parietal. As porções anterior do cerebelo, juntamente com os lóbulos VIII a e b são parte de redes motoras, ao mesmo tempo que a maioria das regiões posteriores do cerebelo são parte de redes, incluindo a região pré-frontal e parietal, mais caracteristicamente associada com as funções cognitivas. Ainda, no estudo realizado nesse trabalho, observaram que em todo o cérebro existem redes distintas associadas a cada lóbulo.

Uma ligação que tem sido estudada e que se tornou relevante foi entre o hipocampo e o cerebelo. O hipocampo tem como uma de suas principais atribuições a navegação espacial, mas não desempenha um papel isoladamente, baseando-se na entrada de informações a partir de outras partes do cérebro. A navegação espacial envolve estímulos internos, tais quais a entrada proprioceptiva e vestibular, e também estímulos externos, como pontos de referência espacial (Rochefort e cols., 2013; Iglói e cols., 2015). Yu e Krook-Magnuson (2015), observaram que o cerebelo tem contribuído na formação das representações espaciais, pois ele recebe a entrada a partir do núcleo vestibular, acreditando-se ser essencial na codificação da inércia, transformando-a em um movimento automático.

O cerebelo também exerce um papel envolvendo o hipocampo no que diz respeito a aprendizagem associativa, como piscar os olhos em sinal de uma resposta ou sentir medo. É característico aprendermos e desaprendermos, e o cerebelo está envolvido neste processo juntamente com o hipocampo através do córtex pré-frontal, por exemplo, na extinção do medo (Chang, 2015). Exemplo de algumas conexões estão ilustradas na Figura 5, abaixo.

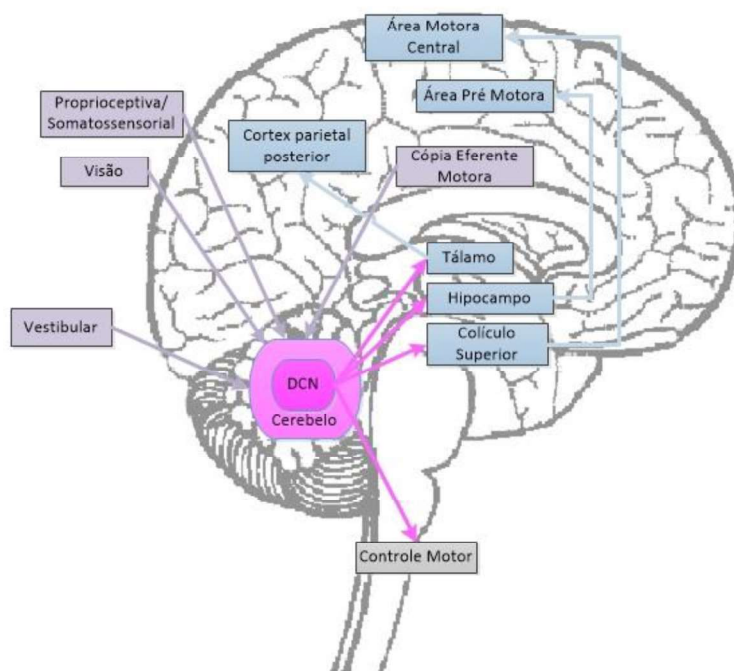


Fig. 5: Exemplo de algumas conexões do cerebelo com o cérebro (figura adaptada de Baumann e cols., 2015).

Os danos cerebelares que podem ocorrer provocam vários sintomas, dentre eles a dismetria, hipotonia, tremor, fala desarticulada, ataxia e distonia. A ataxia é um caso clássico de disfunção cerebelar, ao qual ocorre movimento descoordenado, podendo estar relacionada com inúmeras doenças neurológicas envolvendo a neurodegeneração. A distonia é um distúrbio complexo que provoca contrações musculares involuntárias e contínuas, resultando em movimentos repetitivos, como espasmos e postural de torção. Os sintomas podem ser leves e transitórios, aparecendo apenas em condições de esforço ou fadiga, podendo se tornar grave e constante, fazendo movimentos simples do dia-a-dia impossíveis de serem realizados. O que pode levar a este quadro inclui o stress, a cafeína, e o álcool (Fonnum e Lock, 2000; Reeber, 2013; Kiessling e cols., 2014; Leggio e Molinari, 2015).

1.2 Drogas lícitas de abuso

As drogas lícitas mais consumidas no mundo são o álcool e o tabaco. Existem inúmeras políticas de prevenção e combate ao consumo, como por exemplo a ação global da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO 2014; WHO 2015). Porém, segundo Meyerhoff e cols. (2006), mais de 90% da população que é dependente de álcool, é também tabagista, e que alcoolistas pesados fumam mais do que indivíduos tabagistas não alcoolistas, por isso a importância destas ações.

Os cinco principais fatores de risco registrados em 2010 (hipertensão arterial, tabagismo, incluindo o tabagismo passivo, o consumo de álcool, a poluição do ar doméstico e dietas pobres em frutas) são as principais causas de doença crônica em adultos, dentre elas, cardiovasculares e câncer. Diferenças importantes entre homens e mulheres também existem para determinar a causa de doença atribuível a outros fatores de risco, a maioria para o consumo de tabaco, incluindo fumo passivo e uso de álcool. Os riscos abrangem mais os homens, pois as mulheres fumam e consomem álcool em menor proporção do que os homens. Para as pessoas entre 15-49 anos, o principal fator de risco a nível mundial foi o uso de álcool, seguido pelo fumo do tabaco e incluindo o fumo passivo (Lim e cols., 2012).

1.2.1 Álcool

O consumo de álcool em 2012 foi atribuído 5,9% no total de mortes global, incluindo doenças cardiovasculares com o maior número de mortes causadas pelo álcool (WHO, 2014). O etanol é um produto da fermentação da fruta ou de cereais que afeta todos os órgãos do corpo, mas seus efeitos sobre o SNC são complexos. O mecanismo

de ação de etanol envolve vários sistemas celulares e moleculares neuronais do SNC, causando alterações neurodegenerativas (Fadda e Rossetti, 1998).

A dependência do etanol, bem como a síndrome de abstinência estão associadas ao consumo contínuo e por um longo período. A administração forçada de altas doses de etanol está associada a alterações neuroadaptativas na maioria dos sistemas de neurotransmissores e dos mecanismos de transdução, que são o GABA e o glutamato, os principais neurotransmissores inibitório e excitatório, respectivamente. As mudanças que ocorrem nesses sistemas têm importância fundamental para os efeitos neuroquímicos e comportamentais associados com a dependência do etanol (Fadda e Rossetti, 1998; Fonnum e Lock, 2000; Luo, 2015; Valenzuela e Jotty, 2015).

Outro processo induzido pelo álcool que pode ocorrer é o mecanismo da lesão cerebelar e que provavelmente envolve hipóxia devido ao espasmo dos vasos sanguíneos cerebrais, fluidificação das membranas, acúmulo focal de aldeído tóxico devido ao metabolismo do etanol intraneural, fatores nutricionais e o envelhecimento. A primeira mudança induzida pelo álcool é uma diminuição no volume das camadas granulares e moleculares do cerebelo, já a diminuição no número de CP é observado tardiamente (Karhunen e cols., 1994; Oliveira e cols., 2014).

Dentro do córtex cerebelar, as células granulares estão entre os mais numerosos neurônios do cerebelo. A importância das células granulares do cerebelo é evidente na distribuição da inervação, sendo que uma única fibra musgosa faz conexões sinápticas excitatórias e as células granulosas são os sítios alvos primários de recepção, processamento e integram grande parte das informações aferentes do tronco cerebral, da medula espinhal e dos nervos periféricos através das fibras musgosas. Por conseguinte, estas células se tornam vulneráveis e são um alvo potencial de substâncias exógenas

como o etanol, causando um prejuízo significativo no processamento sensorial aferente do cerebelo (Dar, 2015; Valenzuela e Jotty, 2015).

A exposição ao etanol induz a morte de células da CG por apoptose no cerebelo em desenvolvimento e além disso o etanol também podem inibir a diferenciação das células granulares. As neurotrofinas e fatores de crescimento que desempenham um papel importante na manutenção e sobrevivência de neurônios durante o desenvolvimento do cérebro, quando interferidas, são responsáveis pelos danos induzidos causados pelo etanol no SNC (Luo, 2012).

Em estudos com alcoolistas crônicos, foi observado alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas no SNC e que estão associados aos processos de neurodegeneração. Também, em testes de aprendizagem, foi mostrado que aproximadamente 10% dos alcoolistas desenvolvem distúrbio mental orgânico, transtorno amnésico do álcool ou ainda associado a demência. A síndrome de Wernicke Korsakoff é a mais comumente desordem neurológica relacionada ao alcoolismo. A fase aguda desta síndrome se caracteriza por confusão mental, deficiência na organização espacial, ataxia e perda da memória recente. Quando há comprometimento da memória, se torna persistente e parcialmente reversível (Fadda e Rossetti, 1998; Sullivan e Pfefferbaum, 2005; Dlugos, 2015).

Não obstante, a atrofia cerebelar é uma das principais manifestações neurológicas relacionadas ao abuso de álcool (Karhunen e cols., 1994; Hill e cols., 2015). Esta caracteriza-se clinicamente por ataxia e incoordenação dos membros inferiores. A atrofia e o hipometabolismo do cerebelo foram relatados em estudos com neuroimagem em pacientes alcoolistas e as alterações neuropatológicas do cerebelo abrangem a atrofia da folha cerebelar, bem como a degeneração dos neurônios (Fadda e Rossetti, 1998).

O desenvolvimento do SN é extremamente sensível ao etanol causando uma condição conhecida como síndrome alcoólica fetal. Em experimentos realizados em ratos com administração de etanol durante a gravidez, encontraram o cerebelo como alvo de vários compostos tóxicos e muitos destes compostos tóxicos parecem agir através da excitotoxicidade ou pela produção de radicais livres, sendo a CG e de CP locais preferenciais de neurotoxinas. (Miki e cols., 1999; Fonnum e Lock, 2000; Guerri, 2002;).

Na revisão realizada por Anderson e cols. (2010), exemplificam que as diferenças individuais na estrutura cerebelar ou ainda a ataxia estática foram identificados como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da dependência ao álcool e abuso de outras substâncias. Além disso, os sinais de embriaguez como fala arrastada, falta de coordenação motora, marcha instável, diminuição da atenção e memória podem estar relacionados, pelo menos em parte, com os efeitos do álcool nas funções cerebelares. Também constataram que a região primária de vulnerabilidade à efeitos patogênicos do uso crônico do álcool é o vermis cerebelar, o qual possui uma estrutura complexa que se destingue radicalmente entre as pessoas em suas folhas e lóbulos. O álcool parece afetar rapidamente o plexo coróide e desequilibrar a bioquímica do sangue, o líquido raquidiano e a barreira hematoencefálica, contribuindo para a exposição de neuroativos. Assim, o vermis cerebelar pode ser um componente de um circuito neural de modulação de risco da dependência e abuso de substâncias.

Os níveis excessivos de ingestão de álcool, tanto em homens quanto em mulheres, estão associadas a alterações na fisiologia do cérebro. Em geral, mostram perda significativa do volume em estruturas cerebrais corticais e subcorticais que inclui tanto a substância cinzenta quanto a substância branca. Os lobos frontais são a região mais afetada, juntamente com o córtex frontal superior que mostra significativa perda neuronal. Estes regulam as habilidades cognitivas complexas, tais como memória de

trabalho, ordenação temporal, discriminação e aprendizagem reversa ao qual fundamentam o julgamento, atenção, tomada de decisões e análise de riscos, motivação e humor. Pesquisadores mostraram que a administração de etanol em ratos mais velhos, provoca danos cerebrais que aumentam progressivamente após 2 dias de uso, que vai a partir do bulbo olfatório seguido por outras regiões cerebrais aumentando o dano com o tempo (Sullivan e Pfefferbaum, 2005; Crews e Nixon, 2009).

Fitzpatrick e Crowe (2013), apresentaram em seu estudo a caracterização neuropsicológica e o funcionamento emocional em alcoolistas crônicos. O grupo alcoolista mostrou grande dificuldade na maioria das áreas de funcionamento cognitivo, incluindo habilidades na linguagem, na velocidade psicomotora, em novas aprendizagens e memória e funcionamento executivo. Também mostraram significativa desigualdade em todos os índices de regulação emocional que afetam o processamento, assim como o reconhecimento de expressões faciais de emoções diversas.

O uso do álcool também provoca impactos na produção de novas células no cérebro adulto, podendo alterar o sistema neurogênico de várias maneiras, incluindo o número de células do SNC, a taxa de proliferação e o destino das células que proliferaram (Campbell e cols., 2014). No entanto, existem poucos estudos com animais adultos.

1.2.2 Tabaco

O fumo é responsável por 8,4% de doenças em todo o mundo. Entre os homens (o principal fator de risco) comparado entre as mulheres (quarto maior fator de risco), foi 3,7% maior (Lim e cols., 2012). A Pesquisa Global de Tabaco em Adulto (GATS) é uma pesquisa domiciliar, que foi lançada em fevereiro de 2007 como um novo componente do curso de Sistema de Vigilância Global de Tabaco (GTSS). A GATS permitirá aos países coletar os dados sobre as principais medidas de controle do tabaco na população adulta. Com base no GATS Brasil, estima-se que em 2008 havia 26,6

milhões de tabagistas no Brasil, em uma população de 15 anos ou mais (17,2%). A prevalência entre os homens foi de 21,6% (o que corresponde a 14,8 milhões de homens) e a prevalência entre as mulheres foi de 13,1% (o que corresponde a 9,8 milhões de mulheres). Entre os 17,2% dos tabagistas atuais, 15,1% utiliza o tabaco diariamente, enquanto que 2,1% utiliza ocasionalmente. Este padrão foi observado em todas as regiões do país. O percentual de tabagistas de tabaco a partir de outros produtos como charutos, cachimbos, cigarrilhas, foi baixa: 0,8%, em média. Pela primeira vez no Brasil, foi possível estimar a proporção de utilizadores de tabaco sem fumaça (tabaco mascar e rapé em pó para inalar). Entre os tabagistas diários e ex-tabagistas diários com idade entre 20 e 34 anos, a idade média de início do tabagismo variou de 17 a 19 anos. O tabagismo também foi responsável por 18% de todas as mortes por câncer e 71% de todas as mortes por câncer de pulmão (INCA, 2010).

A fumaça do cigarro consiste de duas fases: uma fase composta de partículas (alcatrão) e uma fase gasosa. As duas fases contém inúmeros radicais livres. Considerando que os radicais associados à fase de gás tem uma vida útil mais curta (segundos), os associados com a fase particulada são mais duradouras (horas a meses). Entre os inúmeros compostos encontrados na fumaça do tabaco, muitos estão associadas com a toxicidade do encéfalo. Estes compostos incluem a amônia, o cresol, o catecol, o monóxido de carbono, as hidroquinonas, o chumbo, a metil etil cetona, o óxido nítrico, o fenol, o estireno, o tolueno, e o butano (Swan e Lessov-Schlaggar, 2007). Além do dano pulmonar, a inalação do fumo pode aumentar a mortalidade em 20% e está associada a outras complicações, como a pneumonia, podendo aumentar a mortalidade em até 60%. Quando se estuda a hipóxia em animais, o cerebelo e o hipocampo exibem mudanças estruturais, propondo que a hipóxia causada pelo cigarro pode afetar a coordenação e funções neurocognitivas (Zou e cols., 2013).

O fumo do tabaco é provavelmente o único e mais significativo princípio de exposição a substâncias químicas tóxicas para os seres humanos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cigarro vai matar quase 9 milhões de pessoas por ano em todo o mundo até o ano de 2030. O tabagismo está associado a um aumento na incidência de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, vasculares e é a principal causa da doença obstrutiva crônica das vias respiratórias. A nicotina, o principal constituinte da fumaça do tabaco, leva a dependência e ao abuso crônico a longo prazo, atuando sobre o sistema colinérgico através dos seus efeitos sobre os receptores nicotínicos e tem sido associada com uma variedade de doenças crônicas, incluindo a toxicidade neurocomportamental seguida de tabagismo. Ainda assim, a administração a curto prazo de nicotina estimula diversas funções cognitivas, tais como a atenção, memória de trabalho e outras funções executivas, da mesma forma podendo causar dependência (Abdel-Rahman e cols., 2004; Swan e Lessov-Schlaggar, 2007).

1.2.3 Associação entre álcool e tabaco

Atualmente os efeitos conhecidos mais devastadores relacionados ao fumo do cigarro estão associados a doenças pulmonares, cardíaca, cânceres e transtornos na função vascular. O tabagismo continua elevado também entre os indivíduos que tem o transtorno pelo uso de álcool. Estudos em animais mostraram que a nicotina aumenta a ingestão voluntária de álcool, pois podem produzir efeitos sinérgicos ou aditivos de recompensa. Também, podem existir fatores genéticos que contribuem simultaneamente para a dependência em álcool e nicotina. Os receptores nicotínicos neuronais (NACHRs) também são alvo de álcool e acredita-se estarem envolvidos não só na dependência de drogas, mas também em diversas funções, como as cognitivas englobando os processos de atenção, aprendizagem e memória, plasticidade sináptica e neuroproteção. A

nicotina, por outro lado, pode superar os efeitos adversos do álcool via ativação seletiva de receptores nicotínicos (Meyerhoff e cols., 2006).

Ainda, podemos observar que a toxicidade induzida por álcool em células granulares do cerebelo podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com a nicotina, o que sugere uma função neuroprotetora para a nicotina, mas os efeitos dos outros compostos da fumaça do cigarro podem ter um efeito diferente. Fumar também pode atenuar as adaptações dos receptores de GABA associados à dependência de álcool e pode contribuir para a comorbidade entre o alcoolismo e o tabagismo (Meyerhoff e cols., 2006).

Apesar de o consumo simultâneo de álcool e tabaco poder levar a morbidade em conjunto com câncer ou úlceras, a incidência de tabagismo é muito alta entre os alcoólicos crônicos. A nicotina é o composto psicoativo primário do cigarro, sendo um forte reforço para o uso do tabaco. A sua neutralização em alguns dos efeitos adversos do álcool pode contribuir para o consumo concomitante de álcool e tabaco (Tizabi e cols, 2005). Também foi sugerido que o consumo de nicotina e álcool faz com que o combate a dependência seja mais difícil, pois são substâncias que compartilham uma ação comum sobre os NACH (Yang e cols., 1999).

Os neurônios corticais cerebelares, são os alvos potenciais para a mediação de alguns dos efeitos do etanol sobre o SNC, bem como sua interação funcional entre etanol-nicotina. Também foi investigado o efeito da nicotina no cerebelo e o comprometimento motor induzido pelo etanol. Uma observação importante foi a capacidade da nicotina atenuar significativamente a ataxia induzida por etanol. Portanto, a interação comportamental entre nicotina-etanol pode representar um antagonismo funcional entre a atividade glutamatérgica excitatória nas fibras musgosas em sinapses ativadas do nAChR por nicotina e uma atividade inibitória GABAérgica causada por

etanol na sinapse de células de Golgi da CG em que os receptores nicotínicos e de eferência glutamatérgica desempenham um papel significativo (Al-Rejaie e Dar, 2006; Taslim e Dar, 2011).

Estudos epidemiológicos mostram que há uma forte relação entre fumar e beber, (Al-Rejaie e Dar, 2006), ambos, tabaco e etanol são conhecidos por afetar os parâmetros cognitivos. No estudo realizado por Abreu-Villaça e cols. (2013), mostra que a exposição ao fumo do tabaco durante a adolescência tem efeitos deletérios e fornece evidência sobre as interações funcionais entre o fumo do tabaco e o consumo de etanol na regulação das respostas comportamentais, apresentando dificuldades na consolidação da memória e aprendizagem.

Gomez e cols., 2015 estudaram o efeito do álcool e do tabaco na memória a longo prazo e na proliferação celular no hipocampo de ratos tratados cronicamente. Os autores mostraram que o tabaco melhora a memória a longo prazo no teste de esQUIVA inibitória e que a associação entre álcool e tabaco reduziu a proliferação celular no giro denteado do hipocampo.

1.3 Apoptose

A apoptose é a via de morte celular induzida por um programa intra-celular extremamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A membrana plasmática da célula continua intacta, mas sua estrutura se altera, tornando a célula apoptótica alvo primário da fagocitose. A célula morta é eliminada antes que seu conteúdo possa vazar evitando uma reação inflamatória (Abbas e cols., 2010).

As caspases são sintetizadas como precursores e são ativadas após a clivagem. Três categorias de caspases têm sido caracterizadas pela sua especificidade do sítio de clivagem do substrato: a geração de caspases pró-inflamatória madura de citocinas (caspase-1, -4, -5) e as caspases que, tradicionalmente, atuam tanto como iniciadores (caspase-6, -8, e -9) ou efetores (caspase-2, -3 e -7) como executores da via apoptótica (Peng e cols., 2002; Martinez e cols., 2015).

A apoptose é provocada por uma cascata de eventos moleculares, como a ativação de caspases. O processo apoptótico pode ser dividido em duas fases, uma fase de ativação, em que as caspases se tornam cataliticamente ativas, e uma fase de execução, em que essas enzimas atuam provocando a morte celular. Existem duas vias principais que conduzem à apoptose: uma via extrínseca, que ativa a caspase-8, e uma via intrínseca ou mitocondrial, que termina com a clivagem e ativação da pró-caspase-3. Ambas as vias convergem afim de ativar a caspase-3. A ativação da caspase-3 produz alterações morfológicas típicas de apoptose. A caspase-3 está ligada à fase efetora de morte celular programada, promovendo a expressão de endonucleases de restrição que cortam o DNA (Abbas e cols., 2010; Oliveira e cols., 2014).

A apoptose neuronal é iniciada por ativação de proteases específicas da família da caspase. A caspase-3, uma das principais proteases de cisteína envolvidos na apoptose, é responsável pela clivagem proteolítica de muitas proteínas. Ela é expressa em muitas células e é o membro mais amplamente estudado da família caspase (Tizabi e cols., 2005). A caspase-3 é altamente expressa no SNC (Oberdoerster e Rabin, 1999) é observada em todos os tipos de morte celular por apoptose, até agora analisadas e a morte celular é prevenida por inibidores de protease da caspase-3, o que sugere que as proteases de caspase-3 estão envolvidas na morte celular (Tanabe e cols., 1998).

A apoptose em neurônios desempenha um papel crucial na remodelação durante o desenvolvimento e pode contribuir para perdas na neurodegeneração (Marks e cols., 1998). É um processo biológico que desempenha uma função fundamental no desenvolvimento do SN e reparo de danos. No decorrer do desenvolvimento, a morte das células é essencial para que ocorra uma regulação no número de células neuronais, e também como proteção contra a proliferação de células anormais (Cregan e cols., 1999; Cheng e cols., 2011).

Outros eventos, tais como a condensação nuclear, a fragmentação da cromatina e a degradação do DNA também são controladas pelas caspases efetoras 3 ou 7, que desmontam as estruturas subcelulares e são ativadas por caspases iniciadoras, tais como as caspases 8 ou 9. A ativação da caspase-3 é geralmente mediada por caspases iniciadoras, como as caspases -2, -8, -9 ou pela ativação da caspase-9, observada na via apoptótica intrínseca, e requer a formação do apoptossomo por interação da caspase-9, factor de activação-1, ATP, e citocromo-c libertado das mitocôndrias (Miñano e cols., 2008).

Oliveira e cols. (2014) constataram que apesar da intoxicação por etanol estar associada aos danos celulares nos circuitos córtico cerebelares, o qual resulta em alterações cognitivas e motoras, parte da morte celular apoptótica ocorre por outros fatores além do consumo de etanol. Chen e cols. (2005), também observaram que a exposição ao etanol provoca a morte neuronal, principalmente por apoptose. No estudo realizado por Tizabi e cols. (2005), foi observado que o uso de etanol resultou num aumento da atividade das caspase-3, altamente relacionada com a apoptose celular.

Rajgopal e cols. (2003), mostraram que a ativação da cascata da caspase-3 em cérebro de ratos que receberam ingestão crônica de etanol pode contribuir para o

processo de apoptose, induzindo alterações estruturais, bem como as vias de sinalização celular e mecanismos de reparo do DNA em diferentes regiões do cérebro, incluindo o córtex cerebral e o cerebelo.

No estudo realizado por Martinez e cols. (2015), foi observado que o consumo crônico de etanol pode causar apoptose das células gliais, levando a um desequilíbrio microambiental e, conseqüentemente, afetando os axônios por causa de sua degeneração, levando a uma transmissão axonal lenta.

1.4 Astroglia

As funções importantes relacionadas com a glia, especialmente os astrócitos, compreendem a produção de vários fatores de crescimento, estruturais e nutritivos, suporte aos neurônios, manutenção do ambiente redox, teor de glutatona presente nos neurônios, a formação da barreira hematoencefálica, a regulação da homeostase da água e captação de vários neurotransmissores (Jaatinen e Rintala, 2008).

É importante destacar que os astrócitos em diferentes fases do desenvolvimento, desde a fase embrionária até a fase pós-natal, são distintos tanto morfológica quanto funcionalmente. Assim como é possível presumir que a astrocitogênese ocorre progressivamente em 4 fases: progenitor das células gliais radiais, proliferação intermediária do progenitor, maturação de astrócitos pós-natal e astrócitos adulto (Molofsky e cols., 2012).

Alguns estudos mostram que o álcool aumenta a produção de moléculas pró-inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, e ciclo oxigenase 2 no

SNC, resultando em neuroinflamação e stress oxidativo que pode levar à morte de neurônios. Os astrócitos desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase do SNC através da manutenção do equilíbrio iônico, regulando o metabolismo energético e a transmissão sináptica, removendo as moléculas neurotóxicas e produzindo fatores neurotróficos. Apesar disso, os astrócitos também agem como células imunes residentes no cérebro e medeiam as respostas imunes inatas no parênquima do SNC. Após a sua ativação, os astrócitos produzem citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, e outras espécies reativas de oxigênio, as quais podem ser induzidas pelo álcool contribuindo para neuropatologia (Kane e cols., 2014; Sofroniew, 2014).

Compreende-se que o processo de astrogliose ocorre tanto celular quanto molecular, consistindo de alterações estruturais da astrogliá incluindo diferentes tipos gliais (microglia, astrócitos e progenitores oligodendrócitos) que podem ser causadas por danos ao SNC e doenças que envolvam uma resposta multicelular, compondo um complexo multivariado de respostas. As mudanças que ocorrem nos astrócitos reativos variam conforme a gravidade da lesão, formando um gradiente contínuo (ilustrados na fig. 6 encontrada na sequência) considerando sua heterogeneidade e diversidade. Ainda tais mudanças podem alterar os astrócitos por ganho ou perda de função (Sofroniew e Vinters, 2010; Sofroniew, 2014).

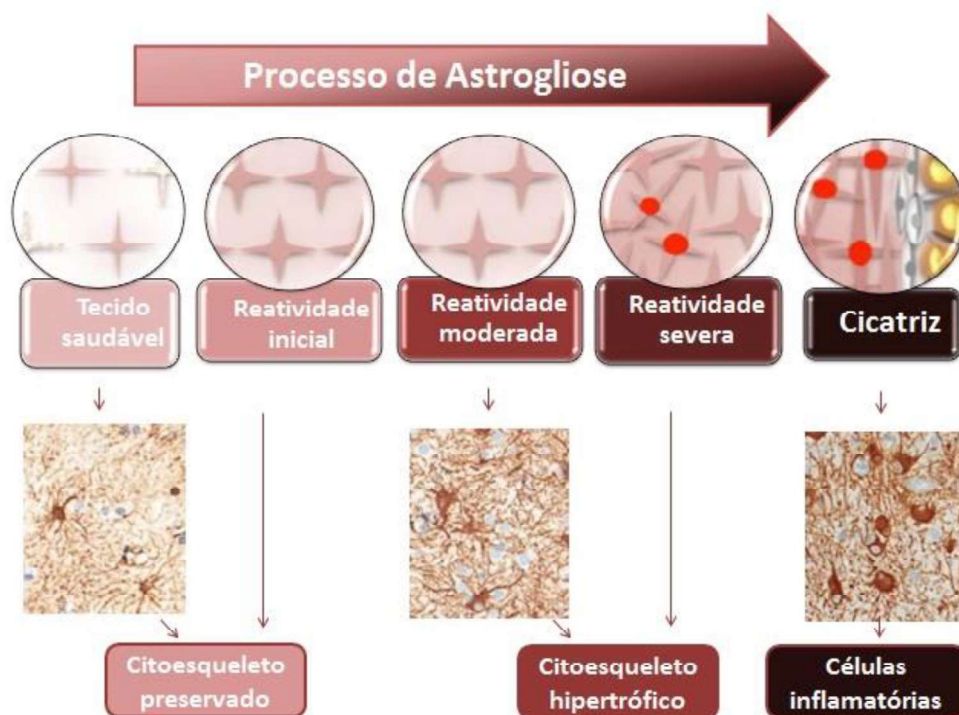


Fig. 6: Esquema do Processo de Astrogliose (imagens adaptadas de Sofroniew e Vinters, 2010; Sofroniew, 2014).

A reatividade leve a moderada apresenta graus variáveis de hipertrofia no corpo celular e tronco dos astrócitos, mas sem perda substancial dos domínios dos astrócitos e sem proliferação. Em contraste, na reatividade severa e difusa ocorre pronunciada marcação do GFAP, hipertrofia, proliferação de astrócitos, alguma perda substancial dos domínios dos astrócitos e uma sobreposição dos processos dos astrócitos vizinhos. A formação da cicatriz astrogliosa ocorre a partir de astrócitos que recém proliferaram e com prolongamentos que se entrelaçam sobre os processos celulares e formam delimitações compactas demarcando as áreas de danos, como necrose, inflamação, trauma, entre outros. Possivelmente o efeito mais prejudicial causado pela astrogliose é a inibição da regeneração do axônio causados pelas cicatrizes dos astrócitos (Sofroniew e Vinters, 2010; Sofroniew, 2014).

Outro termo que tem sido usado para conceituar a interrupção normal das funções dos astrócitos em um tecido saudável tendo como principal causa uma disfunção neurológica é a astrocitopatia, considerando que este conceito abrange também alterações causadas pelo processo de astrogliose (Sofroniew, 2014).

1.4.1 GFAP

Acredita-se que a Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) desempenha um papel importante na manutenção da citoarquitetura do cérebro a longo prazo, incluindo o bom funcionamento da barreira hematoencefálica e modulação das funções neuronais. Os astrócitos são as principais células que provavelmente expressam GFAP, visto que estas células desempenham um importante papel na neuromodulação, neuroproteção, e no controle da orientação do axônio durante o desenvolvimento, na homeostase e na preservação da manutenção da barreira hematoencefálica. A gliose reativa, acompanhada por um aumento na marcação de GFAP, é uma característica de resposta do cérebro imaturo e adulto à lesão por ação de agentes neurotóxicos (Abdel-Rahman e cols., 2004).

A GFAP é a principal proteína de filamento intermediário da CGB e dos astrócitos e tem sido amplamente utilizada como um marcador imunohistoquímico específico para essas células no cerebelo (Shetty e Phillips, 1992). A GFAP desempenha um papel na migração celular, na motilidade, na ancoragem do transportador de membrana do glutamato e na mitose. Também está envolvida nos processos fisiopatológicos ligados aos astrócitos, tais como a astrogliose. O sistema de filamento intermediário dos astrócitos é uma parte muito dinâmica do citoesqueleto da célula e sua expressão é altamente específica, expressando 10 isoformas diferentes de GFAP, em conjunto com a vimentina, nestina, e sinemina compõem filamentos

intermediários como uma plataforma sinalizadora e esqueleto estrutural que coordena a resposta apropriada dos astrócitos na saúde ou doença (Hol e Pekny, 2015).

Ratos expostos a fumaça do cigarro tiveram um aumento da expressão de GFAP em astrócitos do cerebelo e hipocampo (Zou e cols., 2013). Ainda no cerebelo a exposição isolada a nicotina leva a uma diminuição das CP e um aumento na expressão do GFAP no cerebelo, tanto em ratos machos como em fêmeas, ao longo do desenvolvimento (Abdel-Rahman, 2004).

No estudo realizado por Rintala e cols., (2001) mostraram que as células gliais, especialmente os astrócitos, podem ser mais sensíveis ao etanol do que os neurônios, do mesmo modo os danos gliais poderiam iniciar uma disfunção neuronal, levando à degeneração. Foi mostrado que os efeitos do consumo crônico de etanol aumenta a reatividade astrocitária pela medida de GFAP no hipocampo de rato após aproximadamente 3 meses de consumo de etanol. Além do hipocampo, o cerebelo também sofre alterações neurodegenerativas devido a exposição ao etanol.

Na pesquisa realizada por Kane e cols. (2014), os astrócitos em animais adultos tratados com etanol apresentaram um aumento aparente na intensidade da imunorreatividade da GFAP no hipocampo, cerebelo e córtex cerebral em relação aos animais controle. O aumento na imunorreação do GFAP, o tamanho do soma, a largura e comprimento dos astrócitos foi maior quando observado em animais adultos tratados com etanol. Já, Shetty e Phillips (1992) observaram maior imunorreatividade do GFAP nas CGB e nos astrócitos, tanto em ratos expostos ao etanol quanto em ratos controle, porém sem diferença significativa entre os dois.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Fausto N, Kumar V, Cotran RS, Aster JC, Robbins SL. Robbins e Cotran: Patologia-Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.

Abdel-Rahman A, Dechkovskaia AM, Mehta-Simmons H, Sutton JM, Guan X, Khan WA et al. Maternal exposure to nicotine and chlorpyrifos, alone and in combination, leads to persistently elevated expression of glial fibrillary acidic protein in the cerebellum of the offspring in late puberty. *Arch Toxicol.* 2004; 78: 467–476.

Abreu-Villaça Y, Graça ACC, Ribeiro-Carvalho A, Naiff VF, 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.* 2013; 15 (7): 1211-1221.

Albus JS. A Theory of Cerebellar Function. *Math Biosci.* 1971; 10(1-2): 25-61.

Al-Rejaie S, Dar MS. Behavioral Interaction Between Nicotine and Ethanol: Possible Modulation by Mouse Cerebellar Glutamate. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006; 30 (7): 1223–1233.

Anderson CM, Rabi R, Lukas SE, Teicher MH. Cerebellar Lingula Size and Experiential Risk Factors Associated with High Levels of Alcohol and Drug Use in Young Adults. *Cerebellum.* 2010; 9 (2):198–209.

Baizer JS. Unique Features of the Human Brainstem and Cerebellum. *Frontiers in Human Neuroscience.* 2014; 8 (202).

Baumann O, Borra RJ, Bower JM, Cullen KE, Habas C, Ivry RB et al. Consensus Paper: The Role of the Cerebellum in Perceptual Processes. *Cerebellum.* 2015 Oct; 14 (2): 197-220.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. Porto Alegre : Artmed, 2002.

Bellebaum C, Daum I. Cerebellar involvement in executive control. *The Cerebellum.* 2007 Sep; 6 (3): 184-192.

Bernard JÁ, Seidler RD, Hassevoort KM, Benson BL, Welsh RC, Wiggins JL et al. Resting state cortico-cerebellar functional connectivity networks: a comparison of anatomical and self-organizing map approaches. 2012 Aug; 6 (31).

Buckner RL. The Cerebellum and Cognitive Function: 25 Years of Insight from Anatomy and Neuroimaging. *Neuron.* 2013 Oct; 30; 80 (3): 807 – 815.

Campbell JC, Stipcevic T, Flores RE, Perry C, Kippin TE. Alcohol exposure inhibits adult neural stem cell proliferation. *Exp Brain Res.* 2014 Apr; 26; 232 (9): 2775-2784.

- Carlson BM. *Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2014.
- Chang DI, Lissek S, Ernst TM, Thürling M, Uengoer M, Tegenthoff M et al. Cerebellar Contribution to Context Processing in Extinction Learning and Recall. *Cerebellum*. 2015 Dec; 14 (6): 670-676.
- Chen W-JA, Harle LK. Interactive Effect of Alcohol and Nicotine on Developing Cerebellum: An Investigation of the Temporal Pattern of Alcohol and Nicotine Administration. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*. 2005 Mar; 29 (3): 437-442.
- Cheng X-S, Li M-S, Du j, Jiang Q-Y, Wang L, Yan S-Y et al. Neuronal Apoptosis in the Developing Cerebellum. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2011; 40 (1): 21–27.
- Constanzo LS. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Elsevier , 2004.
- Cregan SP et al. Bax-Dependent Caspase-3 Activation Is a Key Determinant in p53 Induced Apoptosis in Neurons. *J Neurosci*. 1999 Sep;15; 19 (18): 7860–7869.
- Crews FT, Nixon K. Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol & Alcoholism*. 2009; 44 (2): 115–127.
- Dar MS. Ethanol-Induced Cerebellar Ataxia: Cellular and Molecular Mechanisms. *Cerebellum*. 2015 Aug; 14 (4): 447-465.
- De la Monte SM e Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol*. 2014 Jan.; 127 (1): 71–90.
- Dlugos CA. Ethanol-Induced Alterations in Purkinje Neuron Dendrites in Adult and Aging Rats: a Review. *Cerebellum*. 2015 Aug; 14 (4): 466-473.
- Fadda F, Rossetti Z. Chronic Ethanol Consumption:From Neuroadaptation to Neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*. 1998 Nov; 56 (4): 385–431.
- Fitzpatrick LE, Crowe SF. Cognitive and Emotional Deficits in Chronic Alcoholics: a Role for the Cerebellum?. *Cerebellum*. 2013 Aug; 12 (4): 520-533.
- Fonnum F, Lock EA. Cerebellum as a target for toxic substances. *Toxicology Letters*.2000 Mar;13; 112–113 : 9–16.
- Gartner LP, Hiatt JM. *Tratado de Histologia em Cores*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
- Gazzaniga MS, Ivry RB, Mangun GR. *Neurociência Cognitiva: A biologia da mente*. Porto Alegre: Artmed; 2006.
- Glickstein M. What does the cerebellum really do? *Current Biology*. 2007 Oct; 9; 17 (19): 824-827.

Glickstein M, Strata P, Voogd J. Review Cerebellum: History. *Neuroscience*. 2009; 162: 549–559.

Gomez R, Schneider R, Quinteros D, Santos CF, Bandiera S, Thiesen FV et al. Effect of Alcohol and Tobacco Smoke on Long-Term Memory and Cell Proliferation in the Hippocampus of Rats. *Nicotine & Tobacco Research*. 2015; 00 (00): 1–7.

Guerri C. Mechanisms Involved in Central Nervous System Dysfunctions Induced by Prenatal Ethanol Exposure. *Neurotoxicity Research*. 2002; 4 (4): 327-335.

Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R. Cellular scaling rules for rodent brains. *PNAS*. 2006; 103 (32): 12138–12143.

Herculano-Houzel S. Coordinated scaling of cortical and cerebellar numbers of neurons. *Front Neuroanat*. 2010 Mar; 4 (12): 1-8.

Hill SY, Lichenstein SD, Wang S, O'Brien J. Volumetric Differences in Cerebellar Lobes in Individuals from Multiplex Alcohol Dependence Families and Controls: Their Relationship to Externalizing and Internalizing Disorders and Working Memory. *Cerebellum*. 2015 Nov; 1-11.

Hoche F, Guell X, Sherman JC, Vangel MG, Schmahmann JD. Cerebellar Contribution to Social Cognition. *Cerebellum*. 2015 Nov; 19.

Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015; 32:121–130.

Iglói K, Doeller CF, Paradis AL, Benchenane K, Berthoz A, Burgess N et al. Interaction Between Hippocampus and Cerebellum Crus I in Sequence-Based but not Place-Based Navigation. *Cereb. Cortex*. 2015; 25 (11): 4146-4154.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Global adult tobacco survey Brazil 2008/ Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2010.

Jaatinen P, Rintala J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. *Cerebellum*. 2008 Sep; 7(3): 332–347.

Kane CJM, Phelan KD, Douglas JC, Wagoner G, Johnson JW, Xu J et al. Effects of Ethanol on Immune Response in the Brain: Region Specific Changes in Adolescent versus Adult Mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014 Feb; 38 (2): 384–391.

Karhunen PJ, Erkinjuntti T, Laippala P. Moderate alcohol consumption and loss of cerebellar Purkinje cells. *BMJ*. 1994 Jun; 25; 308 (6945): 1663–1667.

Kiessling MC, Büttner A, Butti C, Müller-Starck J, Milz s, Hof PR et al. Cerebellar granule cells are generated postnatally in humans. *Brain Struct Funct*. 2014 Jul; 219 (4): 1271-1286.

Leggio M, Molinari M. Cerebellar Sequencing: a Trick for Predicting the Future. *Cerebellum*. 2015 Feb; 14 (1): 35-38.

Leto K, Arancillo M, Becker EBE, Buffo A, Chiang C, Ding B et al. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum*. 2015 Oct.

Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012 Dec ;15; 380(9859):2224-2260.

Luo J. Mechanisms of Ethanol-induced Death of Cerebellar Granule Cells. *Cerebellum*. 2012 Mar; 11 (1): 145–154.

Luo J. Effects of Ethanol on the Cerebellum: Advances and Prospects. *Cerebellum*. 2015 Aug; 14 (4): 383-385.

Machado ABM. *Neuroanatomia Funcional*. São Paulo: Atheneu; 2006.

Marks N, Berg MJ, Guidotti A, Saito M. Activation of Caspase-3 and Apoptosis in Cerebellar Granule Cells. *J. Neurosci. Res*. 1998; 52 (3): 334–341.

Martin JH. *Neuroanatomia: texto e atlas*. Porto Alegre: Artmed; 2013.

Martinez M, Sauce R, Oliveira AS, Chuffa LGA, Stefanini MA, Neto FSL, Takase LF et al. Ethanol intake-induced apoptosis in glial cells and axonal disorders in the cerebellar white matter of UChA rats (voluntary ethanol consumers). *Tissue Cell*. 2015.

Meyerhoff DJ, Tizabi Y, Staley JK, Durazzo TC, Glass JM, Nixon SJ. Smoking Comorbidity in Alcoholism: Neurobiological and Neurocognitive Consequences. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30 (2): 253–264.

Miki T, Harris S, Wilce P, Takeuchi Y, Bedi KS. The effect of the timing of ethanol exposure during early postnatal life on total number of Purkinje cells in rat cerebellum. *J. Anat*. 1999; 194 (Pt3): 423 – 431.

Miñano A, Caballero-Benítez A, Lluch M, Morán J, Rodríguez-Alvarez J. C2 Ceramide Mediates Cerebellar Granule Cells Apoptosis by Activation of Caspases-2,-9, and -3. *J of Neurosci Res*. 2008; 86: 1734–1747.

Miot HÁ, Brianezi G. Análise morfológica do colágeno dérmico a partir da segmentação por conglomerados (clusters) de cor. *An Bras Dermatol*. 2010; 85 (3): 361-4.

Molofsky AV, Krenick R, Ullian E, Tsai H-H, Deneen B, Richardson WD. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & Development*. 2012; 26: 891–907.

Oberdoerster J, Rabin RA. Enhanced caspase activity during ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *Europ J of Pharmacol*. 1999 Dec; 385 (2-3): 273–282.

Oliveira AS, Chuffa LGA, Fioruci-Fontanelli BA, Chuffa LGA, Tirapelli LF, Oishi JC et al. Apoptosis of Purkinje and Granular Cells of the Cerebellum Following Chronic Ethanol Intake. *Cerebellum*. 2014; (13): 728–738.

Peng J, Wu Z, Wu Y, Hsu M, Stevenson FF, Boonplueang R et al. Inhibition of Caspases Protects Cerebellar Granule Cells of the Weaver Mouse from Apoptosis and Improves Behavioral Phenotype. *The J of Biol Chem*. 2002 Nov; 15; 277 (46): 44285–44291.

Rajgopal Y, Chetty CS, Vemuri MC. Differential modulation of apoptosis-associated proteins by ethanol in rat cerebral cortex and cerebellum. *Europ J of Pharmacol*. 2003 Jun; 6; 470 (3): 117–124.

Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV. New roles for the cerebellum in health and disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2013 Nov; 7 (83): 1-11.

Rintala J, Jaatinen P, Kiiänmaa K, Riikonen J, Kemppainen O, Sarviharju M et al. Dose-dependent decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in rat cerebellum after lifelong ethanol consumption. *Alcohol*. 2001 Jan; 23 (1): 1-8.

Rocheffort C, Lefort JM, Rondi-Reig L. The cerebellum: a new key structure in the navigation system. *Frontiers in Neural Circuits*. 2013; 7(35).

Roostaei T, Nazeri A, Sahraian MA, Minagar A. The Human Cerebellum A Review of Physiologic Neuroanatomy. *Neurol Clin*. 2014; 32 (4): 859–869.

Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histological staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001; 23: 291-299.

Sarmiento J. Jonatan sarmiento: Ilustrações. Infografista no ESTADÃO. Ilustração das células do SNC e Ilustração do cérebro humano e do rato. São Paulo; 2016 May.

Schmahmann JD, Pandya DN. The Cerebrocerebellar System. *International Review of Neurobiology*. 1997; 41.

Shetty AK, Phillips DE. Effects of Prenatal Ethanol Exposure on the Development of Bergmann Glia and Astrocytes in the Rat Cerebellum: Na Immunohistochemical Study. *J. Comp. Neurol*. 1992; 321 (1): 19-32.

Smet, HJD, Paquier P, Verhoeven J, Mariën P. The cerebellum: Its role in language and related cognitive and affective functions. *Brain & Language*. 2013 Dec; 127 (3): 334-342

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119:7–35.

Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Nov; 1-17.

Strick PL, Dum RP, Fiez JA. Cerebellum and Nonmotor Function. *Annu. Rev. Neurosci*. 2009; 32: 413–34.

Sullivan EV, Pfefferbaum A. Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology*. 2005 Aug; 180 (4): 583–594.

Swan GE, Lessov-Schlaggar CN. The Effects of Tobacco Smoke and Nicotine on Cognition and the Brain. *Neuropsychol Review*. 2007 Sep; 17 (3): 259–273.

Tanabe H, Eguchi Y, Shimizu S, Martinou JC, Tsujimoto Y. Death-signalling cascade in mouse cerebellar granule neurons. *Euro J of Neurosci*. 1998; 10 (4): 1403–1411.

Taslim N, Dar MS. The Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChR) $\alpha 7$ Subtype in the Functional Interaction Between Nicotine and Ethanol in Mouse Cerebellum. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011; 35 (3): 540–549.

Thomas K, Martin A, Allan A, Cunningham LE. Moderate fetal alcohol exposure impairs neurogenic capacity of murine neural stem cells isolated from the adult subventricular zone. *Experimental Neurology*. 2011; 229 (2): 522–525.

Tizabi Y, Manaye KF, Taylor RE. Nicotine Blocks Ethanol-Induced Apoptosis in Primary Cultures of Rat Cerebral Cortical and Cerebellar Granule Cells. *Neurotoxicity Research*. 2005; 7 (4): 319-322.

Valenzuela CF, Jotty K. Mini-Review: Effects of Ethanol on GABAA Receptor-Mediated Neurotransmission in the Cerebellar Cortex - Recent Advances. *Cerebellum*. 2015 Aug; 14 (4) 438-446.

World Health Organization (WHO). Global Status Report on alcohol and health 2014.

World Health Organization (WHO). WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2015.

Xifró X, Rodríguez-Álvarez J. Delineating the Factors and Cellular Mechanisms Involved in the Survival of Cerebellar Granule Neurons. *Cerebellum*. 2015 Jun; 14 (3): 354-359.

Yang X, Criswell HE, Breese GR. Action of Ethanol on Responses to Nicotine From Cerebellar Interneurons and Medial Septal Neurons: Relations hip to Methyllycaconitine Inhibition of Nicotine Responses. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Jun; 23 (6): 983-990.

Yu W, Krook-Magnuson E. Cognitive Collaborations: Bidirectional Functional Connectivity Between the Cerebellum and the Hippocampus. *Front. Syst.Neurosci*. 2015; 9:177.

Zeeuw CID, Hoogland TM. Reappraisal of Bergmann glial cells as modulators of cerebellar circuit function. *Front Cell Neurosci*. 2015 Jul; 9 (246).

Zou Y-Y, Kan EM, Cao Q, Lu J, Ling E-A. Combustion smoke-induced inflammation in the cerebellum and hippocampus of adult rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013; 39 (5): 531–55.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o índice apoptótico e astrogliose no córtex e substância branca cerebelar de ratos wistar/adultos que inalaram fumaça de cigarro e ingeriram etanol, 2x por dia durante 57 dias.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da administração do álcool e da inalação da fumaça do cigarro, separadamente e em associação nas células gliais presentes na substância branca do cerebelo sobre a imunorreatividade do GFAP.
- Correlacionar os efeitos dos tratamentos separadamente e em associação nas células imuno marcadas com caspase-3 presentes na camada granular e na substância branca do cerebelo.

3 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

EFFECTS OF ETHANOL AND TOBACCO IN CEREBELLUM OF WISTAR RATS

Marília Wallauer¹, Rosane Gomez², Lucas Silva Tortorelli¹, Rosalva Meurer¹, Fernanda Huf¹, Marilda da Cruz Fernandes¹

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre-Laboratório de Pesquisa em Patologia

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Laboratório do Álcool e Tabaco

Abstract: Ethanol and tobacco are the most widely consumed legal drugs in the world. More than 90% of alcohol-dependent individuals are smokers, and heavy alcoholics smoke more than non alcoholics individuals. Studies indicate ethyl alcohol is a factor that affects glial cells, having deleterious function in the nervous system. Nicotine affects alertness, muscle relaxation, cognition and memory. However, the impact of combined ethanol and tobacco on cerebellar cells is not well elucidated. The cerebellum is one of the most susceptible organs to the effect of ethanol during development, undergoing cellular apoptosis. However, few studies have been conducted in adult animals.

The traditional view of the cerebellum, as a coordinator of motor function has been redefined over the past decades, where its role has gained more attention in the modulation of cognitive and emotional processing. **Objective:** To evaluate the apoptotic index in the cortex and cerebellar white matter in adult Wistar rats who inhaled cigarette smoke and ingested ethanol 2x (twice) a day for 57 days. **Methodology:** an experimental study using 32 adult male Wistar rats divided into 4 groups: Control (CTR): receiving glucose solution by gavage; Alcohol (ALC): received ethanol glucose solution by gavage; Tobacco (TAB): received the same glucose solution in group CTR, and

exposed to smoke from 12 burning cigarettes units/ day; Alcohol + Tobacco (ALCTAB): received alcoholic solution as group 2 and exposed to cigarette smoke as TAB. The analysis will be made by Immunohistochemistry techniques for Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and Cleaved Caspase-3. Results: There was no significant difference between groups in cell apoptosis, but the analysis of GFAP showed a significant difference in ALCTAB group compared with the other groups. Conclusions: We conclude that although we have not found significance in apoptosis. We observed a reactive astrocytic process associated with increased GFAP in the group that consumed the drug in combination.

Key words: ethanol, tobacco, cerebellum, apoptose, astrogliosis.

1. Introduction

The brain-cerebellar system coordinates various functions, including control of motor actions, mood and unconscious motivation, thus facilitating non-verbal communication (Schmahmann and Pandya, 1997). Daily actions that need attention, information processing, working memory performance in learning processes, language and visual-spatial navigation, is also related to the role of the cerebellum in the brain-cerebellar circuit (Bellebaum and Daum, 2007). The cerebellum contains about 80% of neurons in the brain (Herculano-Houzel *et al*, 2006;. Herculano-Houzel 2010) and consists of highly regular arrays of neuronal units (Roostaei *et al*, 2014.). The cerebellum composition is virtually the same in all the leaves and lobes having three layers: molecular, Purkinje cells and granular cells (Albus, 1971; Lock and Fonnum, 2000).

Alcohol and tobacco are the most commonly consumed legal drugs around the world. According to Meyerhoff *et al.*, 2006, over 90% of the population is dependent on alcohol are also smokers, and that alcoholics are heavier smokers than non alcoholic

subjects. The harmful use of alcohol and tobacco in the world has been seen to be linked as a main risk factor for causing lung disease, heart cancers (Lim *et al.*, 2012;.. Meyerhoff *et al.*, 2006) and significant changes in the CNS (Abreu-Villaça *et al.*, 2013). Alcohol impairs the function of neurons and glial cells, affecting a wide range of features including neuronal survival, cell migration and glial cells (astrocytes and oligodendrocytes) and differentiation (de la Monte and Kril, 2014). In cerebellum granular neurons go into apoptosis in response to exposure to alcohol. Most studies report that cerebellar lesions arise because of prenatal exposure to alcohol, especially during synaptogenesis (Luo, 2012; Thomas *et al.*, 2011.). Smoking, according to the Global Adult Tobacco Survey (GATS) held in Brazil, is the second most prevalent risk factor for death from NCDs responsible for 18% of all cancer deaths and 71% of all deaths from lung cancer. Damage is associated with tissue exposure to more than 4,000 tobacco compounds, including some reactive species of oxygen and nitrogen, released during the burning of the leaf of this plant (INCA, 2010). Nicotine, the main constituent of tobacco smoke leads to abuse and long-term dependence, acting on the cholinergic system through its effects on nicotinic acetylcholine receptors. The Short-term administration of nicotine improves various cognitive functions such as attention, working memory and other executive functions (Swan and Lessov-Schlaggar, 2007), but may cause a decrease in neuronal cells (Abdel-Rahman, 2004).

Apoptosis is initiated by a cascade of molecular events resulting in caspase activation. There are two main pathways leading to apoptosis: an extrinsic pathway, which activates caspase-8, and an or intrinsic mitochondrial pathway that ends in the cleavage and activation of pro-caspase-3. Both pathways converge to activate caspase - 3. This activation produces morphological changes of apoptosis. Caspase-3 is linked to the effector phase of programmed cell death, promoting the expression of restriction

endonucleases that cleaves DNA (Oliveira *et al.*, 2014). Apoptosis of neurons play a crucial role in the remodeling during development and may contribute to losses in neurodegeneration (Marks *et al.*, 1998).

The important functions related to the glia, especially astrocytes, comprising the production of various growth factors, structural and nutritive, support to neurons, maintaining the redox environment, this glutathione content of neurones, the formation of the blood brain barrier, regulation of homeostasis and water captation of various neurotransmitters (Jaatinen and Rintala, 2008). The glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the major intermediate filament protein in astrocytes and has been widely used as a specific marker for immunohistochemical cerebellar cells (Shetty and Phillips, 1992). It is also related with the cell motility and migration, anchorage glutamate transporter in the membrane and in mitosis. GFAP is involved in pathophysiological processes associated with astrocytes, characterized as astrocytic (Hol and Pěkný, 2015).

It is known that alcohol consumption becomes more likely to occur in smokers than in nonsmokers (Al-Rejaie and Dar, 2006). However, little is known about what this combined exposure to alcohol and tobacco can cause to tissue. Some studies suggest that the use of the two drugs can lead to morbidity and become chronic because the nicotine that is the main component psychoactive cigarette may cause a burnout in some adverse effects caused by alcohol and may contribute to the concomitant use of alcohol and tobacco (Tizabi *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 1999). However, little is known about the effects of chronic association of alcohol and tobacco, requiring further studies to evaluate the effects of this combination on the CNS, reflecting the real human condition of consumption of these two drugs of abuse.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

All procedures performed with animals were approved by the Ethic Committee for Animal Research of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre under protocol 111/13. The sample consisted of 32 adult male Wistar rats weighing between 250 and 300g from the vivarium of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre.

The animals were housed in polypropylene cages (33x17x40 cm) 12/12 photoperiod under a temperature (22 ± 2 ° C) and humidity control of the air. Throughout the study, the animals had free access to food and water except during 2 h (hours) in the morning and 2 h (hours) in the afternoon, when they were placed in airtight chambers, with constant air flow for exposure.

The animals were divided into four groups (n = 8 / group). Control group (CTR) received 2 g / kg glucose solution at 8% by gavage, while the alcohol group (ALC) received 2 g / kg (20% w / v) 95% ethanol in glucose 5% solution by gavage. Both groups were immediately exposed to a flow controlled chamber with ambient air circulation. The Group Tobacco (TOB) received the same glucose solution as the CTR group, however, they were exposed to smoke from burning 12 cigarettes per day (Marlboro red, Philip Morris) in a controlled flow chamber with circulation air filled with smoke. Finally, the Alcohol and Tobacco group (ALCTOB) received an alcoholic solution, as did the ALC group, and was exposed to cigarette smoke sue as the TOB group.

The animals were expose for 57 days, by gavage solution, and then immediately placed in the airtight chambers, with constant air flow of 10 L / min, to a maximum of five animals in each chamber according to their groups. The next morning, the animal

TOB and ALCTOB groups were subjected to smoke from cigarettes with six intervals of 10 minutes between each cigarette for airflow. Then the animals were removed from the chambers, where they remained for about 2 hours and placed in their housing cases. The same procedure was repeated in the afternoon. Thus, animals were submitted to two gavagens and were exposed to the smoke of 12 cigarettes per day.

On day 58, the animals were anesthetized (100 mg / kg) and xylazine (15 mg / kg) and ketamine intraperitoneally after showing signs and symptoms of anesthesia were sacrificed by transcardiac perfusion. In this process, the bodies of animals were prepared by 15 min washing with 0.9% saline (200 mL) followed by pre-fixation with 4% paraformaldehyde for 40 min buffered (400 mL). After this process, the cerebella were removed from animals and stored in containers containing 4% paraformaldehyde buffered 10 times the volume of tissue, for 24 h.

2.2 Preparation of slides

After being removed from 4% paraformaldehyde, cerebellum were placed in an alcohol solution 70% for 24 hours, then embedded in paraffin (EasyPath). The paraffin blocks were sectioned at 5 μ m thickness on a microtome (Leica RM2255). The slides were prepared from each animal, each containing three sections and a total of nine sections per animal.

2.3 Immunohistochemistry

Slides were deparaffinized in an oven at 70 ° C and then placed in xylene immersion (two baths for 2 min each), absolute ethanol (three baths 2 min each) and distilled water.

Caspase-3: antigen retrieval was performed in sodium citrate buffer pH 6.0 at 98° C for 20 minutes. After the blocking of endogenous peroxidase with hydrogen peroxide 30 Va 5% in methyl alcohol for 10 minutes was performed (3 times) protected from light. Nonspecific proteins were blocked with BSA (bovine serum albumin in PBS pH 7.4 Triton X-100, 0.05%) (Sigma ®) 1% for 1 hour at room temperature. Then, the primary monoclonal anti - cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology ® # 12692, 1: 500) was applied over each sample and initially incubated for 1 hour at room temperature, after over-night at 4 C. After this incubation, the samples were washed with PBS for 5 minutes (3 times) and incubated with secondary antibody conjugated with peroxidase SignalStain® Apoptosis Kit and incubated for 40 minutes. Finally, DAB was incubated for 3.5 minutes and the slides were counterstained with hematoxylin for 12 seconds, dried and then mounted Entellan®. Samples were analyzed by two researchers through Software Image J®, counting 1000 cells in granular layer in each section, being used sections 6 and 12 images (two images per section) per mouse. For the analysis of white matter were used sections 6 and 24 images (4 images per section) per animal were counted and the total number of image cells.

GFAP initially endogenous peroxidase was blocked in 5% 30V hydrogen peroxide in methanol, followed by blocking of non-specific binding with 1% BSA (bovine serum albumin in PBS pH 7.4 Triton X-100; 0.05%) for 2 h. The primary antibody used was anti-human monoclonal mouse anti-GFAP 1: 500 (glial fibrillary acidic protein - Clone: 6F2 - DAKO®; M0761) over-night at 4° C. After this period, the samples were washed with PBS triton for 5 minutes (3 times) and incubated with secondary and tertiary monoclonal antibody Advance HRP® Kit (DAKO®) for 40 minutes each with washing between the incubations. After the slides were washed again and incubated with DAB (DAKO®) for 3 minutes.

2.4 Quantitative analysis of immunohistochemistry of GFAP

The samples were photographed by a camera attached to a microscope (Olympus), increased 20x. These images were quantified using Software Image J® (Media Cybernetics®), 4 each slice images being used, 9 sections per mouse for analysis of four areas in each image, a total of 144 areas analyzed per animal.

2.5 Statistical analysis

Results presented are expressed as mean \pm standard deviation. The homogeneity of variances analysis was conducted in Levene's test, the parametric analysis by two-way ANOVA with post hoc Newman-Keuls and nonparametric analysis using the Kruskal-Wallis test.

The level of significance was $\alpha = 0.05$ at the 95% confidence interval. Analyses were performed using the Statistic version 8.0 program.

3. Results

3.1 Immunohistochemistry of caspase-3

Statistical analysis of the immunohistochemistry for quantification of caspase-3 in the granular layer and white matter cerebellum was realized through parametric ANOVA test duplicate. The choice of parametric test was based on analysis of variance homogeneity by Levene's test ($p > 0.05$).

There were significant differences in the white matter. Figure 1 shows representative immunohistochemical images. The average of the experimental groups were: CTR = 34.16; ALC = 36.17; TOB = 38.92; ALCTAB = 38.29. Further descriptive details are shown in Table 1. The statistical effects observed by two-way ANOVA were

there differences in tobacco factor (Tobacco main effect, $F(1, 28) = 4.66$ and $p = 0.03$). However, no differences were observed in alcohol factor (Ethanol main effect, $F(1, 28) = 0.005$ and $p = 0.94$) and interaction of factors (Ethanol x Tobacco interaction, $F(1, 28) = 1.39$ $p = 0.24$). Further analysis revealed no differences between the groups (Newman-Keuls post hoc test, $p > 0.05$).

There were no statistically significant differences in the granular layer. Figure 2 shows representative immunohistochemical images. The average of the experimental groups were: CTR = 6.77; ALC = 6.44; TOB = 7.47; ALCTAB = 6.85. Further descriptive details are shown in Table 1. The statistical effects observed by two-way ANOVA were as follows: (Ethanol main effect, $F(1, 28) = 0.58$, $p = 0.45$; Tobacco main effect, $F(1, 28) = 1.78$ and $p = 0.19$; Ethanol x Tobacco interaction, $F(1, 28) = 0.35$ and $p = 0.55$).

3.2 Immunohistochemistry for GFAP

The analysis of the quantification of GFAP shown in Figure 3 was held the nonparametric Kruskal-Wallis ANOVA, based on non-homogeneity of variances (Levene's test $p = 0, 049$). The Kruskal-Wallis test showed differences between the groups ($p = 0.009$) and post hoc differences between CTRxALCTOB group ($p = 0.01$), and the TABxALCTOB group ($p = 0.04$). ALC group showed no difference compared to the other groups ($p > 0.05$). These results are shown in Graphic 1.

4. Discussion

Our study showed a significant increase in the quantification of GFAP in animals that were exposed to cigarette smoke and alcohol received in relation to other groups.

According to Abdel-Rahman *et al.* (2004), and Blutstein *et al.* (2013) treated rats and guinea pig, pregnant, respectively, with nicotine and analyzed the offspring in early adulthood, showing an increase in GFAP expression in the cerebellum and hippocampus. Fuller *et al.* (2010) treated young mice with cigarette and found significant results in GFAP expression in the cerebellum and hippocampus. Zou *et al.* (2013) exposed the adult rat inhalation of smoke showing an increase in GFAP expression in the cerebellum and hippocampus. In our study we used different protocols with the exposure of cigarette smoke, but did not find significant differences in GFAP expression in the cerebellum, only when combined ALCTOB.

As the TOB group, the group that was treated with alcohol alone showed no change. This data is comparable to the work of Dlugos and Pentney (2001) and Franke (1995), which used protocols with different concentrations of ethanol and mice of different ages, however Rintala *et al.* (2001) using older rats, observed a decrease in expression of GFAP by ethanol consumption compared to adolescent rats.

When analyzing the apoptotic index in the granular layer and white matter of the cerebellum, our results showed no significant differences in either group. According Oberdoerster *et al.* (1999) using a model in vitro also did not observe effects of ethanol in the activation of caspase-3. Martinez *et al.* (2015), using older mice and preferably ethanol consumption, evaluated the effect of ethanol on the activation of caspase-3 to determine the neuronal death. In the results observed an increase in apoptosis rate, which is possibly explained by a population more susceptible to study cell damage. Unpublished data from our research group also analyzed the Caspase-3 in the hippocampus, showing increased rate of apoptosis, suggesting differences in sensitivity between the hippocampus and the cerebellum.

Our results suggest astrogliosis in ALCTOB group not accompanied by apoptosis in this group. A possible reason for this is that astrogliosis may have been beneficial to the fabric as part of the immune defense, where the increase in GFAP shows the state of reactive astrocytes protective manner ensuring cell survival. Protocols using older animals exhibit cell death (Martinez *et al.*, 2015) and possibly also associated with astrocytic, but more chronic and harmful given their development during senescence. More histopathologic characterizations are necessary to better understand the observed phenomenon, as other markers of astrocytic proteins as well as the participation of other cellular elements (eg: microglia).

Although some studies show that moderate alcohol use has neuroprotective effects and that nicotine, one of the cigarette constituents, increases cognitive performance users (Al-Rejaie and Dar, 2006; Meyerhoff *et al.*, 2006; Taslim and Dar, 2011), little is known about the effects of chronic association of alcohol and cigarette smoke. Our study opens up more possibilities for interaction research these drugs, more research between is needed to evaluate the effects of this combination on the CNS, reflecting the real human condition to the exposure of these two drugs combined.

Conclusion

The protocol used was not able to induce apoptosis significantly in cerebellar cells, however, the combination of ethanol and inhaling the cigarette smoke induced astrogliosis cerebellar.

These findings highlight the importance of further studies related to the combination of these drugs, reflecting the associated condition of consumption of these substances in humans.

Acknowledgements

This research was conducted with financial support from development agencies CNPq and CAPES. The authors are appreciative of the Alcohol and Tobacco Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul and the staff of the Research Laboratory of Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre.

Declaration of Interests

The authors declare no conflicts of interest, including financial, personal, or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence, the present study.

References

- Abdel-Rahman A, Dechkovskaia AM, Mehta-Simmons H, Sutton JM, Guan X, Khan WA et al. Maternal exposure to nicotine and chlorpyrifos, alone and in combination, leads to persistently elevated expression of glial fibrillary acidic protein in the cerebellum of the offspring in late puberty. *Arch Toxicol.* 2004; 78: 467–476.
- Abreu-Villaça Y, Graça ACC, Ribeiro-Carvalho A, Naiff VF, 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.* 2013; 15 (7): 1211-1221.
- Albus JS. A Theory of Cerebellar Function. *Math Biosci.* 1971; 10(1-2): 25-61.
- Al-Rejaie S, Dar MS. Behavioral Interaction Between Nicotine and Ethanol: Possible Modulation by Mouse Cerebellar Glutamate. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006; 30 (7): 1223 - 1233.
- Bellebaum C, Daum I. Cerebellar involvement in executive control. *The Cerebellum.* 2007 Sep; 6(3): 184-192.
- Blutstein T, Castello MA, Viechweg SS, Hadjimarkou MM, McQuail JA, Holder M et al. Differential Responses of Hippocampal Neurons and Astrocytes to Nicotine and Hypoxia in the Fetal Guinea Pig. *Neurotox Res.* 2013 July ; 24(1): 80 - 93.
- De la Monte SM e Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2014 Jan.; 127(1): 71–90.

Dlugos CA, Pentney RJ. Quantitative immunocytochemistry of glia in the cerebellar cortex of old ethanol-fed rats. *Alcohol* 23 (2001) 63-69.

Fonnum F, Lock EA. Cerebellum as a target for toxic substances. *Toxicology Letters*. 2000 Mar;13; 112–113 : 9–16.

Franke H. Influence of chronic alcohol treatment on the GFAP-immunoreactivity in astrocytes of the hippocampus in rats. *Acta histochem*. 1995 Feb; 14; 97: 263-271.

Fuller BF, Gold MS, Wang KKW, Ottens AK. Effects of Environmental Tobacco Smoke on Adult Rat Brain Biochemistry. *J Mol Neurosci*. 2010 May ; 41(1): 165-171.

Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R. Cellular scaling rules for rodent brains. *PNAS*. 2006; 103(32): 12138–12143.

Herculano-Houzel S. Coordinated scaling of cortical and cerebellar numbers of neurons. *Front Neuroanat*. 2010 Mar; 4(12): 1-8.

Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015; 32:121–130.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Global adult tobacco survey Brazil 2008 / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2010.

Jaatinen P, Rintala J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. *Cerebellum*. 2008 Sep; 7(3): 332–347.

Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012 Dec ;15; 380 (9859):2224-2260.

Luo J. Mechanisms of Ethanol-induced Death of Cerebellar Granule Cells. *Cerebellum*. 2012 Mar; 11(1): 145–154.

Marks N, Berg MJ, Guidotti A, Saito M. Activation of Caspase-3 and Apoptosis in Cerebellar Granule Cells. *J. Neurosci. Res*. 1998; 52(3): 334–341.

Martinez M, Sauce R, Oliveira AS, Chuffa LGA, Stefanini MA, Neto FSL, Takase LF et al. Ethanol intake-induced apoptosis in glial cells and axonal disorders in the cerebellar white matter of UChA rats (voluntary ethanolconsumers). *Tissue Cell*. 2015.

Meyerhoff DJ, Tizabi Y, Staley JK, Durazzo TC, Glass JM, Nixon SJ. Smoking Comorbidity in Alcoholism: Neurobiological and Neurocognitive Consequences. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30 (2): 253–264.

Oberdoerster J, Rabin RA. Enhanced caspase activity during ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *Europ J of Pharmacol*. 1999 Dec; 385 (2-3): 273–282.

Oliveira AS, Chuffa LGA, Fioruci-Fontanelli BA, Chuffa LGA, Tirapelli LF, Oishi JC et al. Apoptosis of Purkinje and Granular Cells of the Cerebellum Following Chronic Ethanol Intake. *Cerebellum*. 2014; (13): 728–738.

Rintala J, Jaatinen P, Kiianna K, Riikonen J, Kemppainen O, Sarviharju M et al. Dose-dependent decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in rat cerebellum after lifelong ethanol consumption. *Alcohol* 23 (2001) 1-8.

Roostaei T, Nazeri A, Sahraian MA, Minagar A. The Human Cerebellum A Review of Physiologic Neuroanatomy. *Neurol Clin*. 2014; 32(4): 859–869.

Schmahmann JD, Pandya DN. The Cerebrocerebellar System. *International Review of Neurobiology*. 1997; 41.

Shetty AK, Phillips DE. Effects of Prenatal Ethanol Exposure on the Development of Bergmann Glia and Astrocytes in the Rat Cerebellum: An Immunohistochemical Study. *J. Comp. Neurol*. 1992; 321 (1): 19-32.

Swan GE, Lesov-Schlaggar CN. The Effects of Tobacco Smoke and Nicotine on Cognition and the Brain. *Neuropsychol Review*. 2007 Sep; 17(3): 259–273.

Taslim N, Dar MS. The Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChR) $\alpha 7$ Subtype in the Functional Interaction Between Nicotine and Ethanol in Mouse Cerebellum. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011; 35(3): 540–549.

Tizabi Y, Manaye KF, Taylor RE. Nicotine Blocks Ethanol-Induced Apoptosis in Primary Cultures of Rat Cerebral Cortical and Cerebellar Granule Cells. *Neurotoxicity Research*. 2005; 7(4): 319-322.

Thomas K, Martin A, Allan A, Cunningham LE. Moderate fetal alcohol exposure impairs neurogenic capacity of murine neural stem cells isolated from the adult subventricular zone. *Experimental Neurology*. 2011; 229 (2): 522–525.

Yang X, Criswell HE, Breese GR. Action of Ethanol on Responses to Nicotine From Cerebellar Interneurons and Medial Septal Neurons: Relations Hip to Methyllycaconitine Inhibition of Nicotine Responses. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Jun; 23(6): 983-990.

Zou Y-Y, Kan EM, Cao Q, Lu J, Ling E-A. Combustion smoke-induced inflammation in the cerebellum and hippocampus of adult rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013; 39(5): 531–55

Appendix

Table 1. Descriptive statistics immunohistochemical quantification for caspase-3 in the cerebellum

		White matter	Granular layer
	N	mean \pm SD	mean \pm SD
Control	8	34,164 \pm 2,39	6,776 \pm 0,75
Ethanol	8	36,175 \pm 6,06	6,446 \pm 0,99
Tobacco	8	38,927 \pm 4,16	7,478 \pm 1,27
Ethanol + Tobacco	8	38,298 \pm 5,61	6,850 \pm 0,81

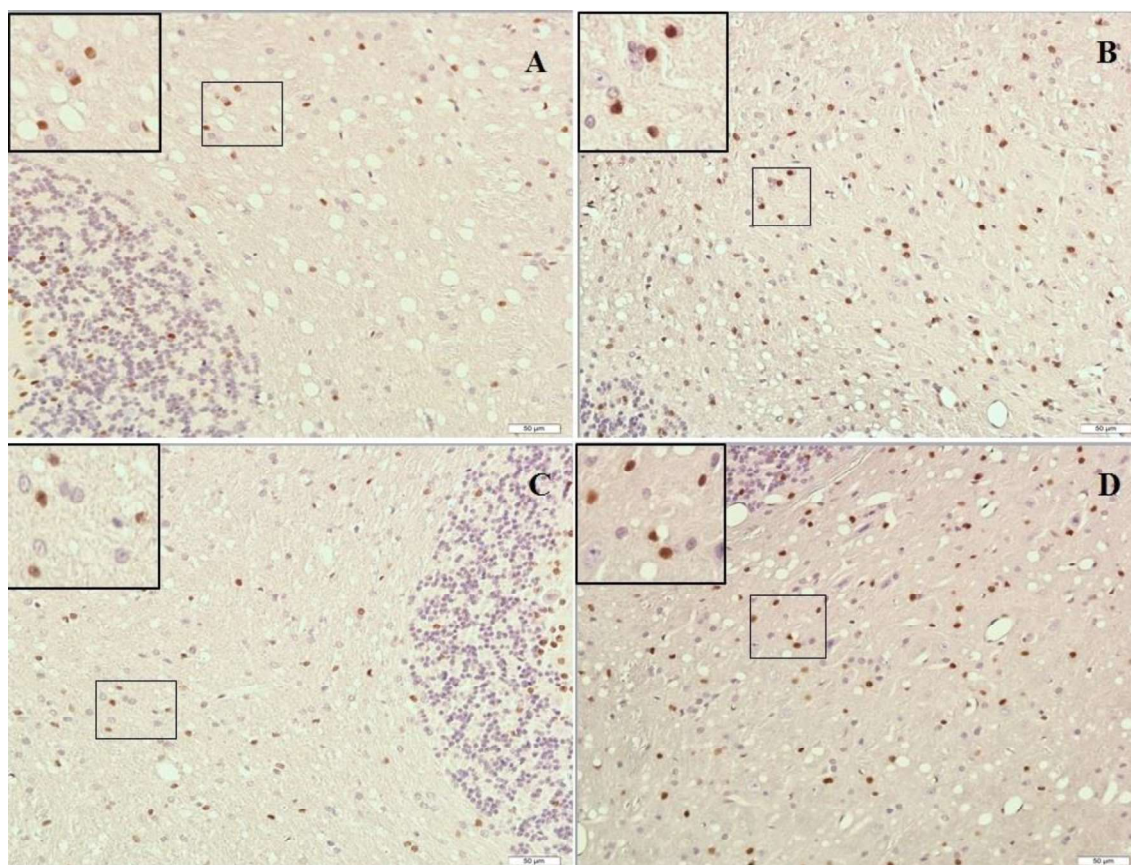


Fig.1: Image of the white matter of the cerebellum and immunoreactive cells for caspase-3. A: Control (CTR), B: alcohol (ALC), C: Tobacco (TOB), D: + Alcohol Tobacco (ALCTOB). The increase was objective 20x.

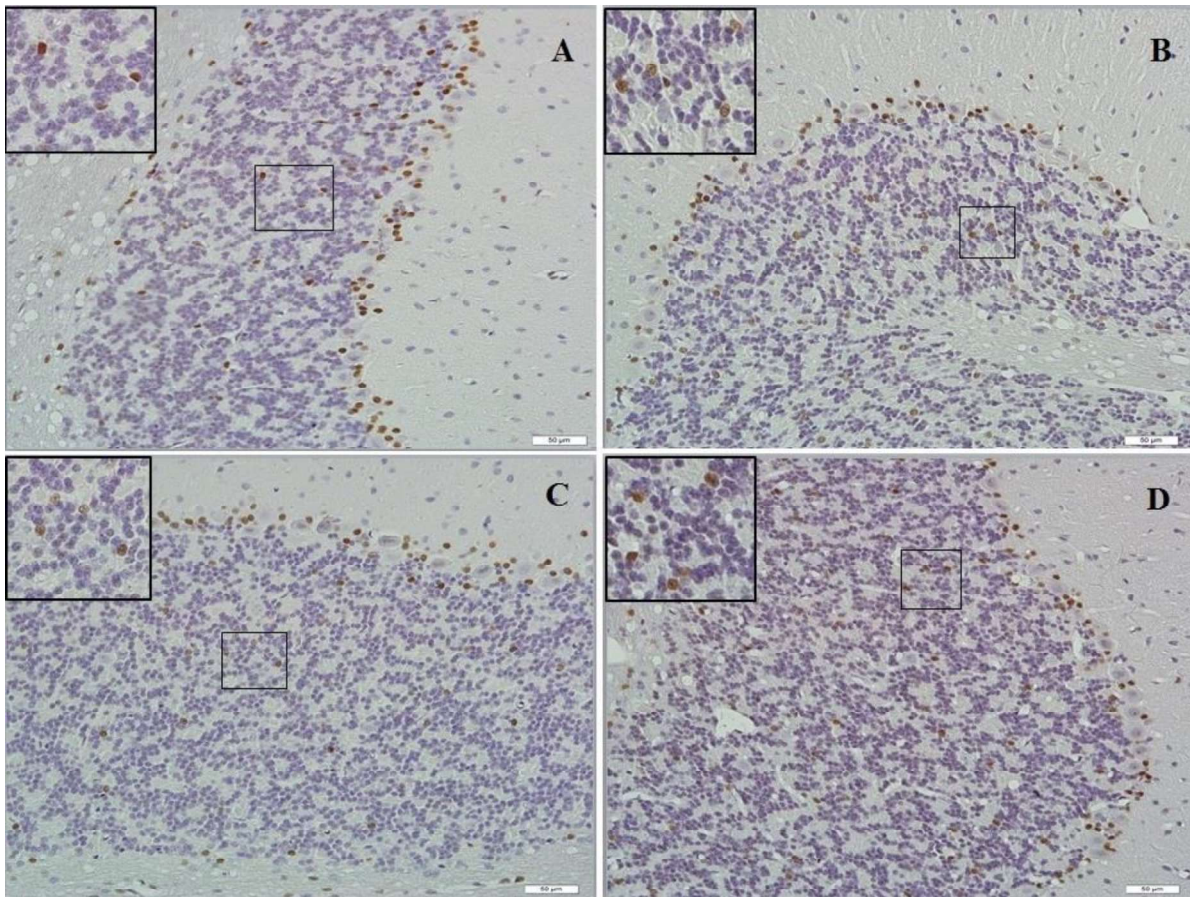


Fig. 2. Image layer and granular cerebellar cells immunoreactive for caspase-3. A: Control (CTR), B: alcohol (ALC), C: Tobacco (TOB), D: + Alcohol Tobacco (ALCTOB). The increase was objective 20x.

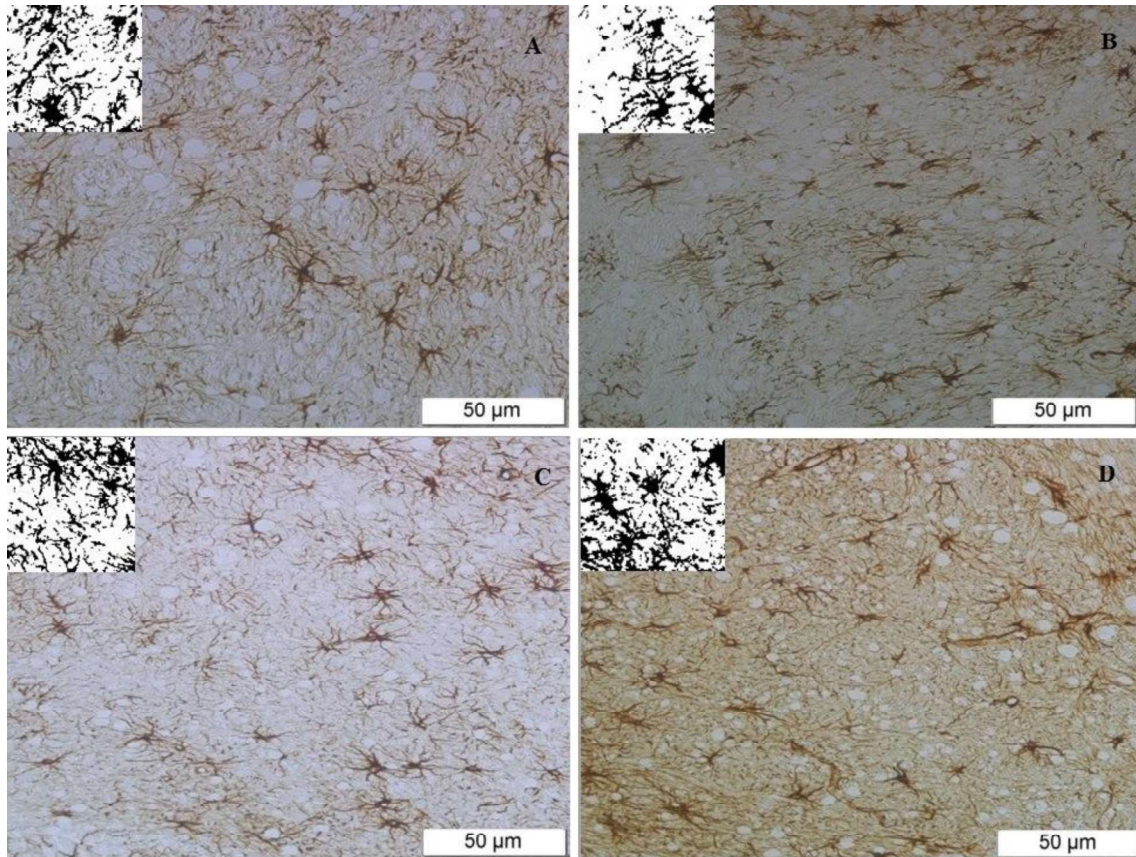
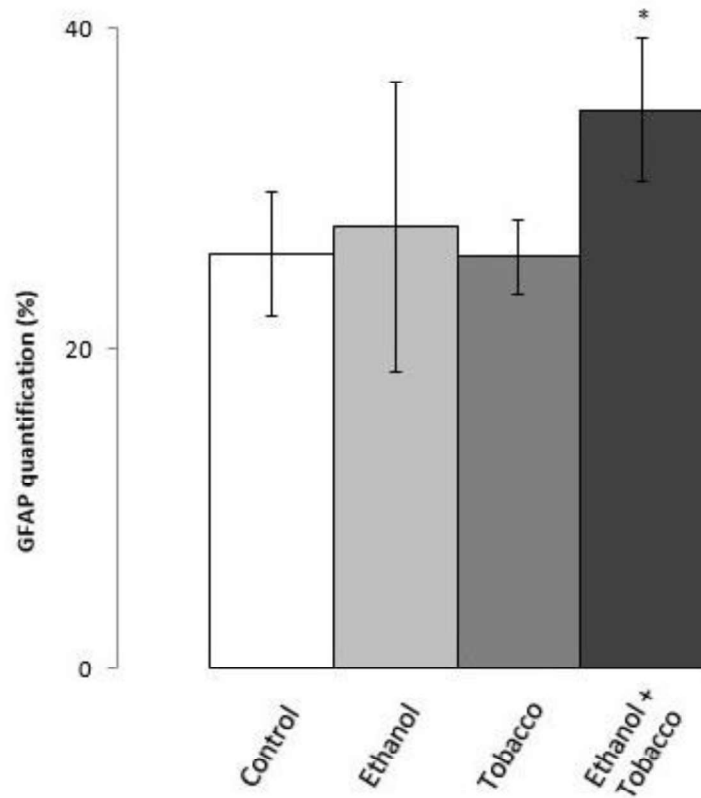


Fig. 3: GFAP immunoreactive cells. A: Control (CTR), B: alcohol (ALC), C: Tobacco (TOB),

D: + Alcohol Tobacco (ALCTOB). The increase was objective 20x.



Graphic 1: quantitative immunohistochemical analysis, the data are expressed as mean \pm standard deviation. * Indicates statistically significant differences compared to control groups and tobacco, assuming $p < 0.05$.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O álcool e o tabaco são as drogas lícitas mais consumidas no mundo, causando problemas relacionados ao SNC, especialmente ao cerebelo, afetando o controle motor bem como a cognição. Porém pouco se sabe sobre os efeitos da associação crônica de álcool e da fumaça do cigarro, justificando assim a pesquisa realizada.

Nossos resultados mostram que o consumo de álcool e a inalação da fumaça do cigarro causam uma astrogliose no cerebelo, somente quando ocorre a associação entre álcool e tabaco.

No entanto não encontramos aumento no número de células em apoptose em nenhum dos grupos o que aparentemente não caracterizaria essa astrogliose como processo prejudicial.

Referente à abordagem desta temática, se fazem necessárias mais pesquisas relacionadas ao uso do álcool e do tabaco em animais adultos. Visto que a maioria dos estudos já realizados são com animais em que o SNC ainda está em desenvolvimento, torna-se importante, portanto, pesquisar esta temática com animais adultos.

5. ANEXOS

5.1 Análise digital das reações Imunohistoquímicas

5.1.1 Quantificação do GFAP

A técnica chamada de morfometria se dá por conta da fotografia digital, ao qual constitui uma matriz de pixels em que as intensidades de cor, posições, arranjos e interrelações são definidas e invariáveis para cada imagem, o que favorece a análise quantitativa e de contagem (Miot, 2010).

Podemos utilizar softwares gratuitos, como o Image J[®], para analisar as imagens conforme o que estamos buscando. Neste caso, utilizamos a técnica de deconvolução da cor da imagem (Ruifrok e Johnston, 2001), associado à marcação binária e posterior leitura da porcentagem da área marcada.

A deconvolução de cores e a análise ocorre da seguinte maneira:

1. Software Image J[®]
2. Seleção da imagem
3. Aplicar o Plugin “colour deconvolution”
4. Utilizar a imagem decomposta na cor marrom (DAB)
5. Transformação binária em que a cor preta vai indicar as zonas marcadas
6. Registro da porcentagem obtido em 4 áreas diferentes selecionadas da imagem
7. Cálculo da média obtida de todas as áreas.

Abaixo o passo a passo detalhado:

1. Foram obtidas as imagens para análise em um microscópio óptico Olympus DP72 com câmera acoplada. Foram obtidas 3 lâminas com 3 secções cada, sendo 4 imagens para cada corte, totalizando 36 imagens, capturadas pelo software DP2-BSW. Em cada imagem foram analisados 4 áreas diferentes, tendo em sua totalidade 144 áreas.

O programa utilizado foi o Image J®, com seu layout ilustrado na imagem abaixo:

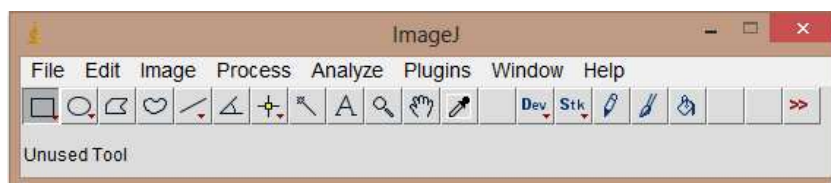


Fig. 1: Layout do Programa Image J®

2. As imagens obtidas na objetiva de 20x com a barra de calibração de 50 μ , no tamanho de 2426x2679 pixels e intensidade de cor de 24 bits, gerando arquivos que foram salvos em formato JPEG. O modelo de cores utilizado foi do RGB (Red, Green, Blue).

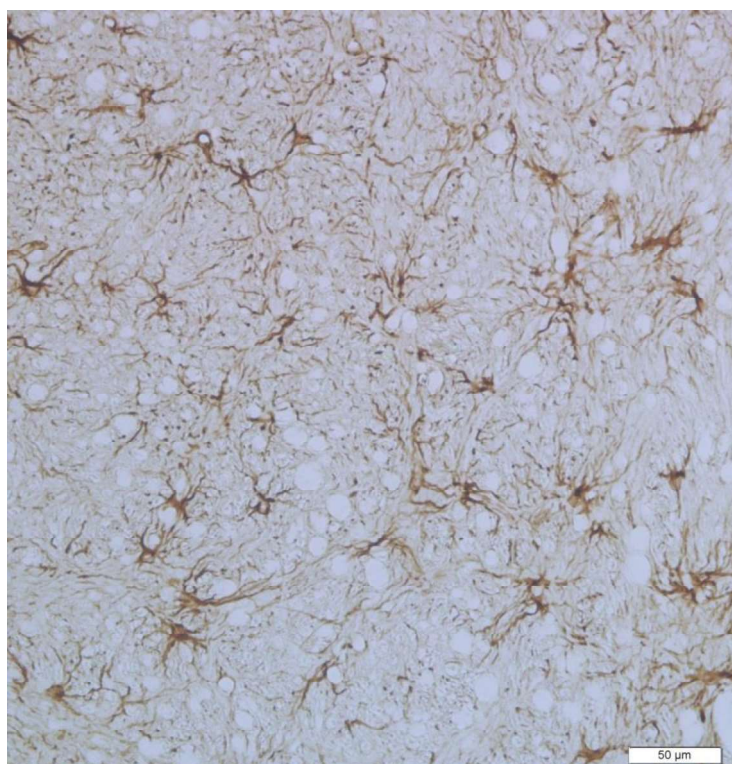


Fig. 2: Imagem obtida dos casos utilizados neste trabalho.

3. Análise digital da imagem através do plugin da deconvolução de cor (DC), (Fig.3), ao qual faz a separação das cores, a transformação binária e a leitura das áreas selecionadas. A DC promove a decomposição das cores, separando os três componentes RGB presentes nas regiões coradas pelo cromógeno DAB, gerando 3 imagens: uma de cor predominante azul, outra verde-clara (ou branca) e outra marrom. O objetivo é a marcação da cor marrom, resultante da coloração pelo DAB, e consequentemente dos locais de imunorreação positiva. Somente esta imagem foi utilizada para quantificação.

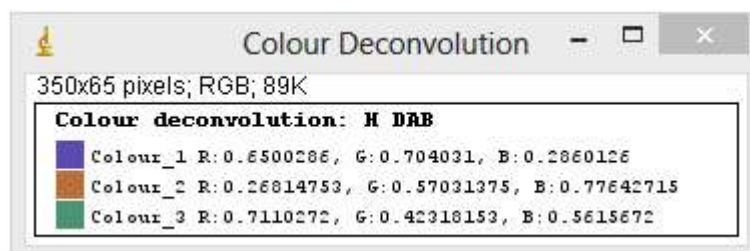


Fig. 3: Plugin deconvulação da cor

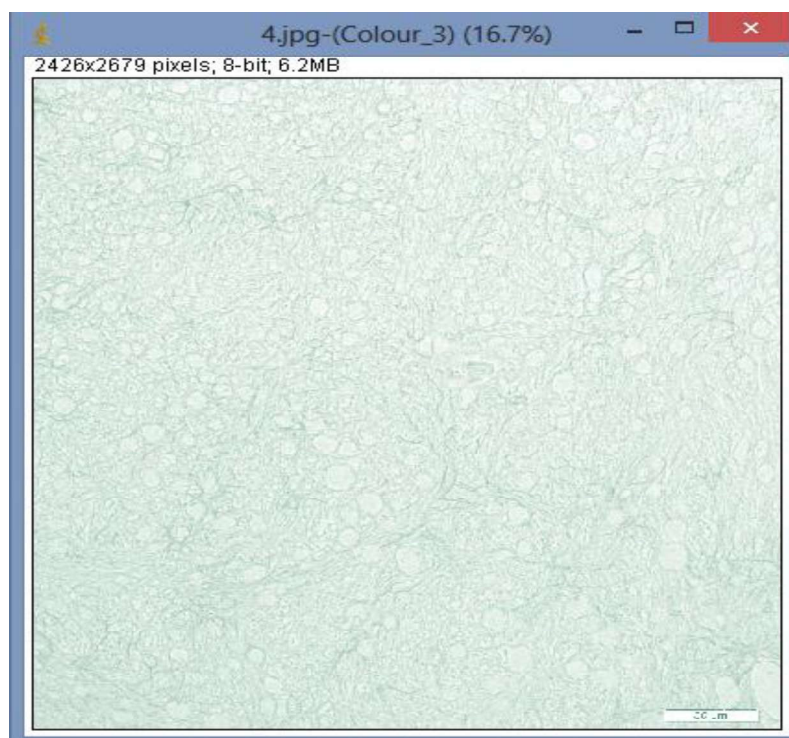


Fig. 4: Imagem gerada na cor verde clara (ou branca)

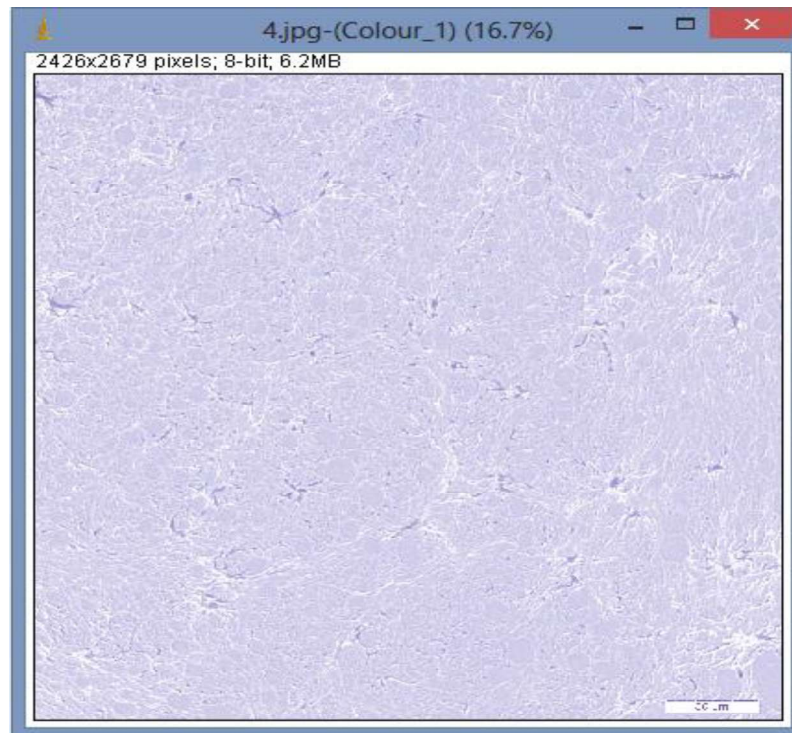


Fig. 5: Imagem gerada na cor azul

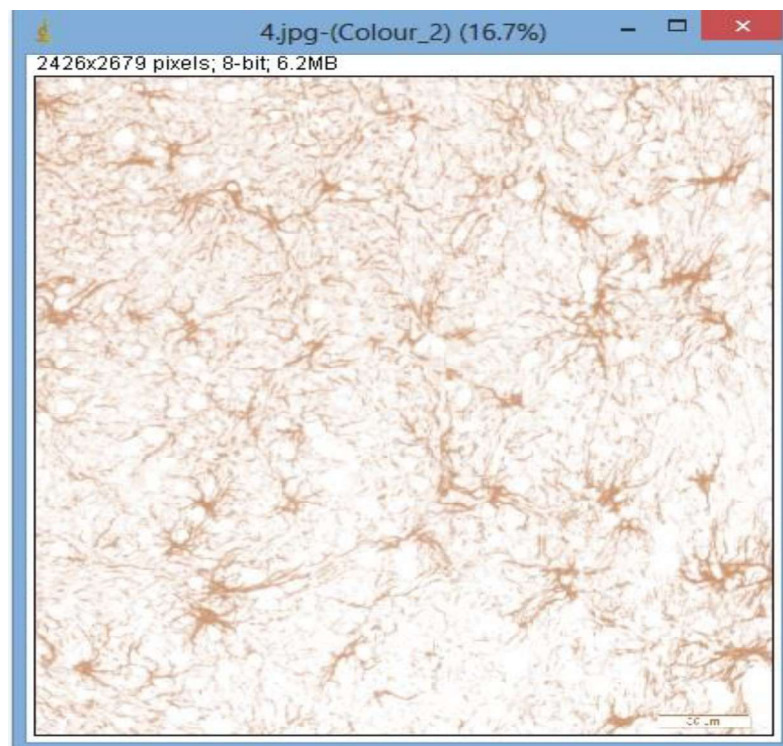


Fig. 6: Imagem gerada na cor marrom (DAB)

4. Para a conversão binária da imagem (figura 7), foi utilizado a imagem gerada na cor marrom (DAB).

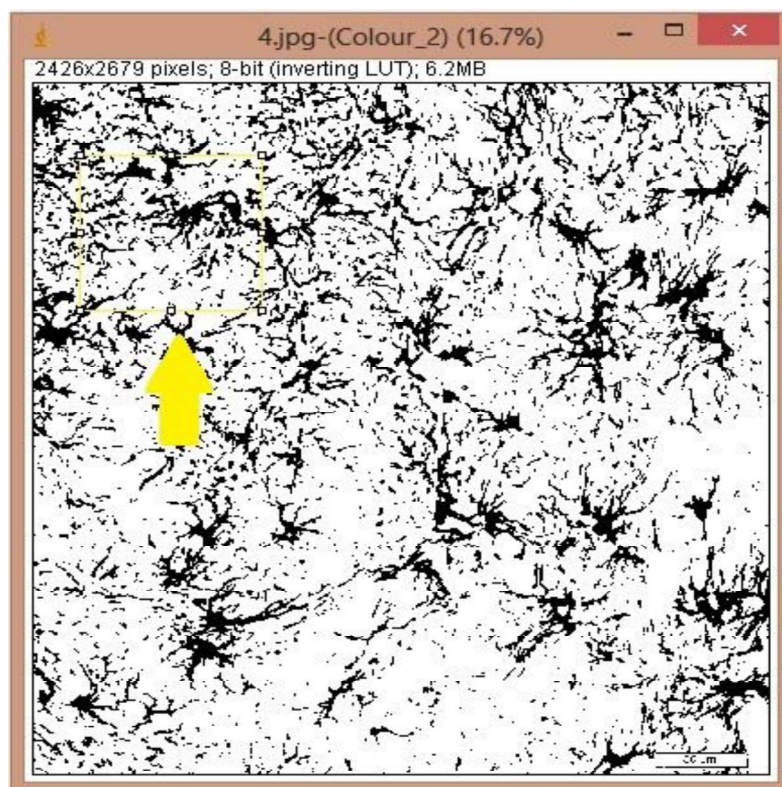


Fig. 7: Conversão binária (preto e branco)

5. Para a análise, foi criada uma macro que gerou um quadrado amarelo (600x600 pixels), totalizando 360.000 pixels . Após, para obtenção da porcentagem fez-se o comando no teclado (Ctrl M).

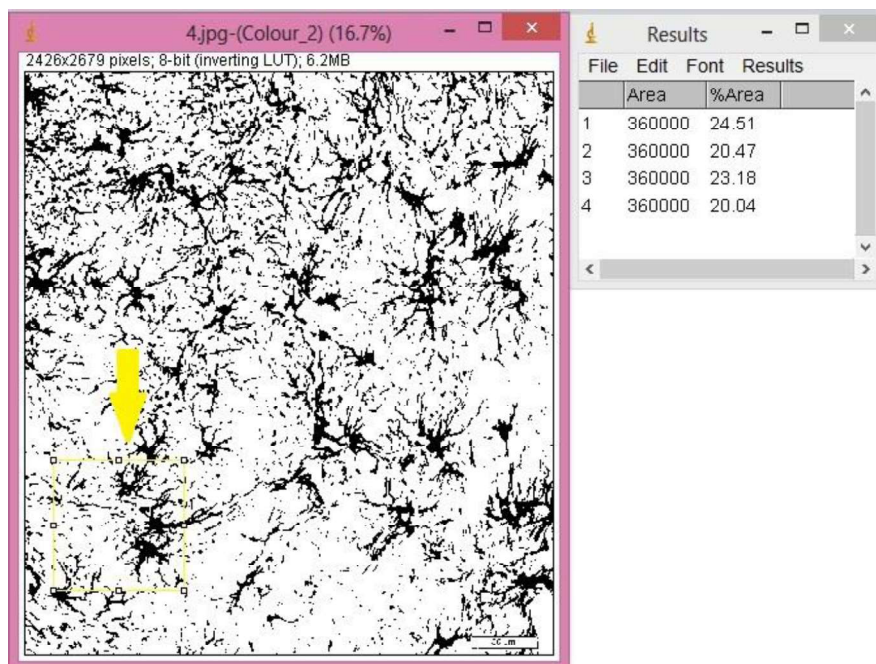


Fig. 8: Análise da área com a porcentagem ao lado.

5.1.2 Contagem das células em apoptose

A contagem celular se deu na CG do córtex cerebelar e na substância branca, utilizando o programa Image J[®] e foi realizada por 2 analisadores. Na CG foram contadas 1000 células no total em cada imagem e na substância branca foram contadas o total de células encontradas na imagem. Para a contagem na CG, foram feitas 12 imagens de cada rato e para a substância branca foram feitas 24 imagens de cada rato. Após a contagem, foi realizado a média de cada rato e de cada grupo.

Passo a passo da contagem:

1. Software Image J[®]

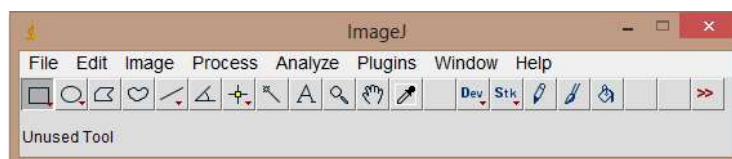


Fig. 9: Layout Image J[®]

2. Seleção da imagem

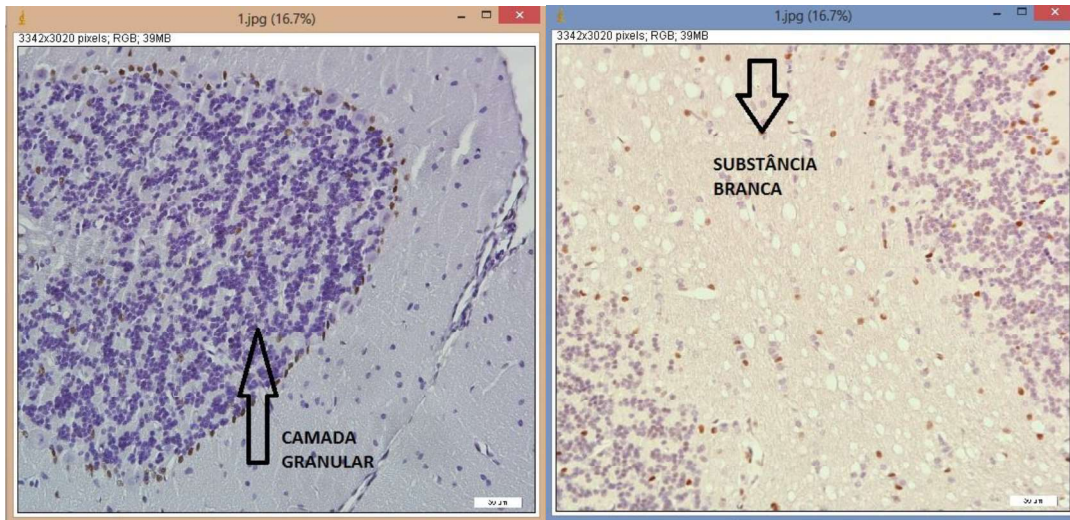


Fig. 10: Imagem CG

Fig. 11: Imagem Substância branca

3. Selecionar no programa: Plugins > Analyze > Cell counter e iniciar a contagem

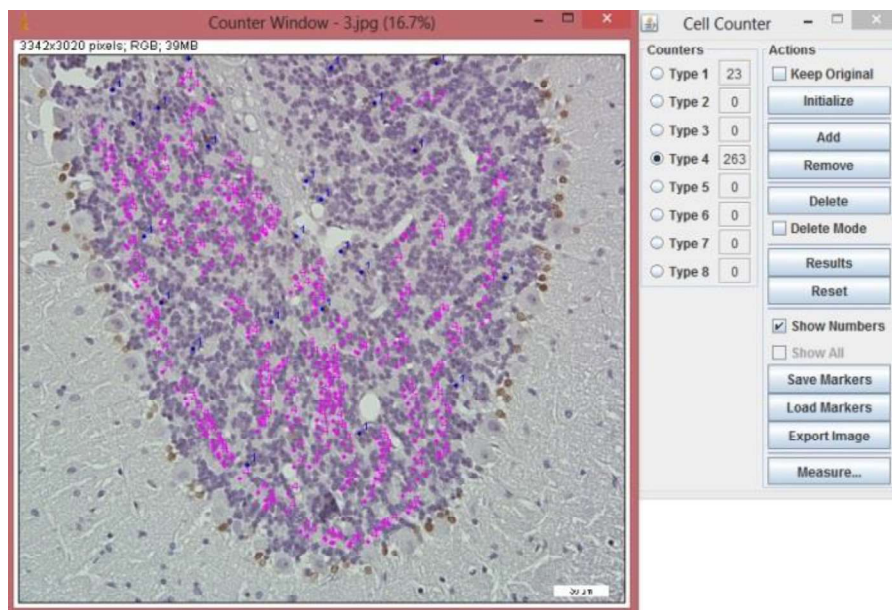


Fig. 12: Contagem celular CG

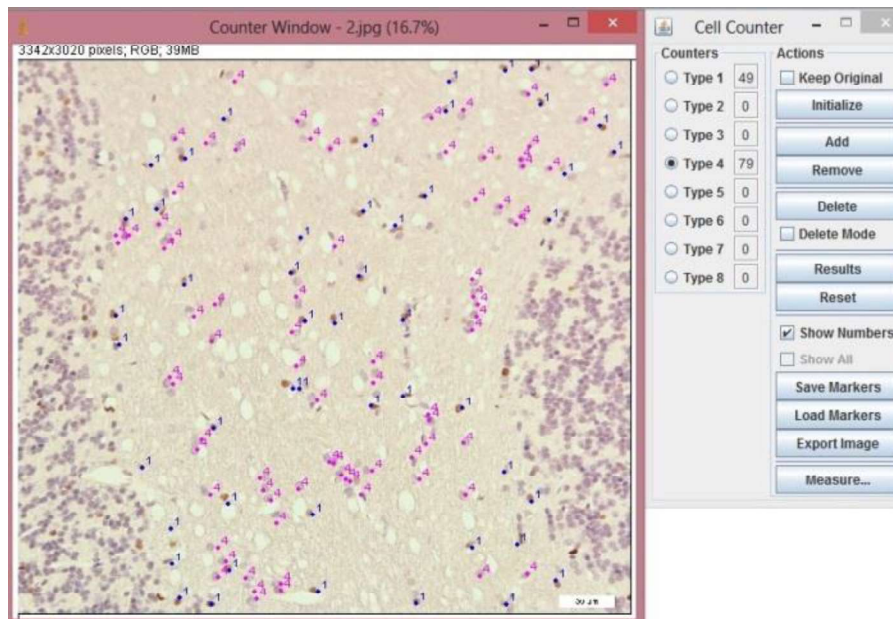


Fig. 13: Contagem na substância branca

5.2 Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

 **COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
UFCSPA**

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 13-111 **Versão do Projeto:** **Versão do TCLE:**

Pesquisadores:
MARILDA DA CRUZ FERNANDES
ROSANE GOMEZ
FERNANDA HUF

Título: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO ETANOL E DO TABACO SOBRE A PROLIFERAÇÃO
CELULAR HIPOCAMPAL.

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.


Porto Alegre, 09 de maio de 2013.