

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

**Fernanda Huf**

**Efeito da Associação do Etanol e do  
Tabaco nas células do giro denteado  
do hipocampo**

**UFCSPA**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Porto Alegre  
2015

**Fernanda Huf**

# **Efeito da Associação do Etanol e do Tabaco nas células do giro denteado do hipocampo de ratos**

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: Dr<sup>a</sup>. Marilda da Cruz Fernandes  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Rosane Gomez

**Porto Alegre  
2015**

## Catalogação na Publicação

Huf , Fernanda

Efeito da associação do etanol e do tabaco na células do giro denteado do hipocampo de ratos / Fernanda Huf .  
-- 2015.

73 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015.

Orientador(a): Marilda da Cruz Fernandes ;  
coorientador(a): Rosane Gomez.

1. Neurociências. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata aos meus pais Madalena Huf, Adilson Luiz Huf e ao meu irmão, Adilson Huf, pelo carinho, amor, dedicação, pois sempre me apoiaram em todas minhas decisões e estiveram ao lado nos tropeços da minha caminhada.

Á minha querida cunhada Priscila Maciel pelo carinho.

Á minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilda da Cruz Fernandes quero mostrar minha profunda admiração e respeito pela pessoa amável e profissional extremamente dedicada, que apostou em mim e me ensinou muito com nossa convivência.

Á minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Rosane Gomez, agradeço pelos ensinamentos, compreensão, por abrir as portas de seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Ao grande grupo do Laboratório de álcool e tabaco da UFRGS, quero agradecer ao trabalho braçal em todos os dias do experimento, a dedicação, ao carinho e respeito com o qual me receberam.

As minhas alunas de Iniciação Científica, Gabriela Galli dos Santos, Júlia Peixoto, Juliana Bresolin e Tayonara Piagette quero dizer de todo meu coração, muito obrigada, tão dedicadas e responsáveis me mostraram que para conquistarmos algo, precisamos de humildade e ajuda mútua.

As Incríveis técnicas do Laboratório de Pesquisa em Patologia, Keli Reiter, Rosalva Thereza Meurer, Teresinha Stein, obrigado por estarem do meu lado no que foi necessário, por me mostrarem como é bom trabalhar ao lado de amigas.

Minhas colegas de aula e laboratório, vocês tornaram esses 2 anos de caminhada, mais leve, alegre, me ensinaram que trabalho em equipe é a melhor opção, obrigada por fazerem parte da minha vida.

Algumas amigas fizeram a diferença nessa caminhada como Janaína Kehl de Castilhos, Jenifer Huana Port, Dayane Quinteros, Lisiane Zavalhia, Carolina Müller, Luiza Gea e Gabriela Motta a vocês meus profundos agradecimentos, estarão para sempre em meu coração.

A Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que de certa forma contribuíram para esse projeto realizar-se.

A todos meus sinceros agradecimentos sem vocês essa conquista não seria possível.

**SUMÁRIO**

LISTA DE ABREVIATURAS .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
RESUMO.....	X
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Revisão da literatura.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Neurogênese e formação hipocampal .....	2
1.1.2 Células gliais – Astrócitos .....	9
1.1.3 Apoptose .....	13
1.1.4 Consumo de etanol .....	14
1.1.5 Inalação da fumaça de cigarro .....	21
1.1.6 Associação do etanol e fumaça de cigarro .....	25
<b>1.2 Referências bibliográficas.....</b>	<b>27</b>
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>3 Artigo científico.....</b>	<b>36</b>
<b>4 Considerações finais.....</b>	<b>59</b>

<b>5 Anexos.....</b>	<b>60</b>
5.1 Termo de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa com animais.....	60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Aldh 1L1	Enzima metabólica aldeído desidrogenase 1
Apo 1	Apolipoproteína 1
AVC	Acidente vascular cerebral
Bcl-2	B cell lymphoma 2, gene regulador de apoptose
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CA	Corno de Amon
CD95	Proteína de superfície, receptor importante para apoptose
CE	Córtex entorrinal
COHb	Carboxihemoglobina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DR4	Receptor que promove morte celular
DR5	Receptor que promove morte celular
FAS	Receptor que promove morte celular
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GD	Giro denteado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
Hb	Hemoglobina
HPA	Eixo neuroendócrino hipotalâmico-hipofisário-adrenal
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IGF-1	Fator de crescimento ligado a insulina

INCA	Instituto Nacional do Câncer
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potencialização de longa duração
MAO	Enzima monoaminoxidase
NeuN	Antígeno nuclear neuronal
RMS	Fluxo migratório rostral
Sb	Subículo
SGZ	Zona subgranular
SNC	Sistema nervoso central
SVZ	Zona subventricular
TGF- $\beta$ 1	Fator de transformação do crescimento beta 1
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TRAIL	Receptor que provoca apoptose
TSP	Trombospondina
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
WHO	Organização mundial da saúde

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Desenho ilustrativo da formação hipocampal .....	3
Figura 2. Neurogênese na zona subventricular.....	6
Figura 3. Neurogênes no giro denteado do hipocampo .....	7
Figura 4. Sinapse Tripartite .....	11

## RESUMO

**Introdução:** O álcool e o tabaco são drogas lícitas de alto consumo mundial. Sabe-se que álcool provoca muitas comorbidades no sistema cardiovascular, gastrointestinal e age sobre o sistema nervoso central (SNC) afetando a neurogênese e apoptose celular, podendo atuar também sobre as células gliais. O tabaco por sua vez, está associado a inúmeras mortes por ano, relacionado ao câncer principalmente de pulmão. Tem a nicotina como princípio ativo e esta causa alterações no SNC, principalmente alterando sinapses. Pouco se sabe sobre os efeitos dessas drogas no SNC quando usadas em associação, principalmente no que diz respeito à de fumaça do cigarro e não somente à nicotina. **Objetivo:** avaliar a apoptose e alterações em células glias de ratos Wistar expostos ao etanol e fumaça de cigarro, bem como a sua associação. **Materiais e métodos:** foram utilizados 40 ratos Wistar machos adultos, divididos em quatro grupos: grupo controle (CTR), grupo álcool (ALC), grupo tabaco (TAB) e grupo álcool e tabaco (ALCTAB), que receberam etanol, via gavagem e foram expostos a fumaça de 12 cigarros diariamente por 57 dias. Utilizou-se a técnica de imuno-histoquímica para caspase-3 e anti-GFAP, em cortes do giro denteado do hipocampo desses animais. A quantificação foi feita por contagem das células em apoptose e densitometria óptica (DO) das células GFAP positivas. **Resultados:** para a apoptose encontramos valores estatisticamente significativos para o grupo TAB quando comparado ao CTR e para o grupo ALCTAB quando comparado ao grupo CTR e ao grupo ALC. Na DO observamos valores inferiores e estatisticamente significativos para o grupo ALC, TAB e ALCTAB em relação

ao CTR. **Conclusão:** Nas nossas condições experimentais principalmente a fumaça do cigarro levou a apoptose no giro denteado do hipocampo, tanto de maneira separada como em associação e também as drogas provocaram alterações nas células gliais.

**Palavras-chaves:** Álcool, tabaco, apoptose e células gliais.

## 1. Introdução

O etanol e o tabaco são as drogas lícitas mais consumidas no mundo. Estudos mostram que mais de 90% dos indivíduos dependentes de álcool são fumantes e que alcoolistas pesados fumam mais do que indivíduos não alcoolistas (Meyerhoff e cols., 2006).

O alcoolismo é uma doença crônica, associado a muitas comorbidades como doenças cardiovasculares, hepáticas, renais, gastrointestinais e psiquiátricas (Zernig e cols., 2000; Fleming e cols., 2005). O etanol no Sistema Nervoso Central (SNC) atua como depressor com efeito ansiolítico e sedativo levando a incoordenação motora, retardando o tempo de reação, desinibição, relaxamento, euforia, agitação, déficit cognitivo e de memória (Virani e cols., 2009).

O tabagismo por sua vez, está associado a inúmeras mortes prematuras por ano (Storr e cols., 2010), relacionadas ao câncer de pulmão em cerca de 80-90% dos casos e também ao câncer de faringe, boca, estômago, além de outras doenças pulmonares, cardiovasculares, gastrointestinais e acidente vascular cerebral (AVC), (WHO, 2002). Durante a queima da folha da planta, ocorre a exposição tecidual a mais de 4000 compostos (Stedman e cols., 1968). Com relação ao SNC, a nicotina é o principal componente ativo da fumaça do cigarro, dependendo do padrão de uso, os efeitos são o estado de alerta, a redução da ansiedade e o relaxamento da musculatura, além do aumento da cognição e da memória (Crooks e Dwoskin, 1997).

O impacto da associação do álcool etílico e do tabaco sobre as células do SNC ainda não está bem elucidado. Um estudo que avalia o uso dessas

drogas em associação mostra que o uso combinado pode potencializar seus efeitos prazerosos (Virani e cols., 2009). No SNC, estudos em camundongos, relatam principalmente que a associação entre álcool e nicotina, leva há uma redução da neurogênese e um aumento na apoptose hipocampal, provocando déficit de memória e aprendizado (Jang e cols., 2002; Abreu-Villaça e cols., 2007; Oliveira-da-Silva e cols 2009).

Nos estudos com intoxicações por drogas, muita atenção é dada para os neurônios, mas as células da glia, também são afetadas por essas drogas e por sua vez atuam dando suporte para os neurônios e para o funcionamento tecidual. Um estudo aponta o álcool etílico como um fator que afeta as células da glia, assim exercendo uma função deletéria para o sistema nervoso (Santos e cols., 2013).

Porém não há estudos que avaliem os efeitos da associação do etanol e da fumaça do cigarro, levando em consideração esses parâmetros como alterações gliais, neurogênese e apoptose hipocampal, sabendo que a fumaça do cigarro além da nicotina contém outras substâncias neurotóxicas.

## **1.1 Revisão da Literatura**

### **1.1.1 Neurogênese e formação hipocampal**

O hipocampo é um faixa curva de córtex filogeneticamente primitivo, de aproximadamente quatro centímetros de comprimento, localizada na porção

medial do lobo temporal. Ele estende-se por todo o comprimento do assoalho do corno inferior (ou temporal) do ventrículo lateral (Bear e cols., 2008).

O termo hipocampo é comumente utilizado para descrever conjuntamente duas regiões interligadas, que muitas vezes são chamadas de formação hipocampal: o giro denteado (GD) e o hipocampo propriamente dito (Corno de Amon, CA), ambos possuem uma organização interna trilaminada, composta por dois tipos celulares: as células granulares do giro denteado e as células piramidais do Corno de Amon, sendo estas divididas nos setores CA1, CA2, CA3 e CA4 (Figura 1), (Bear e cols., 2008).

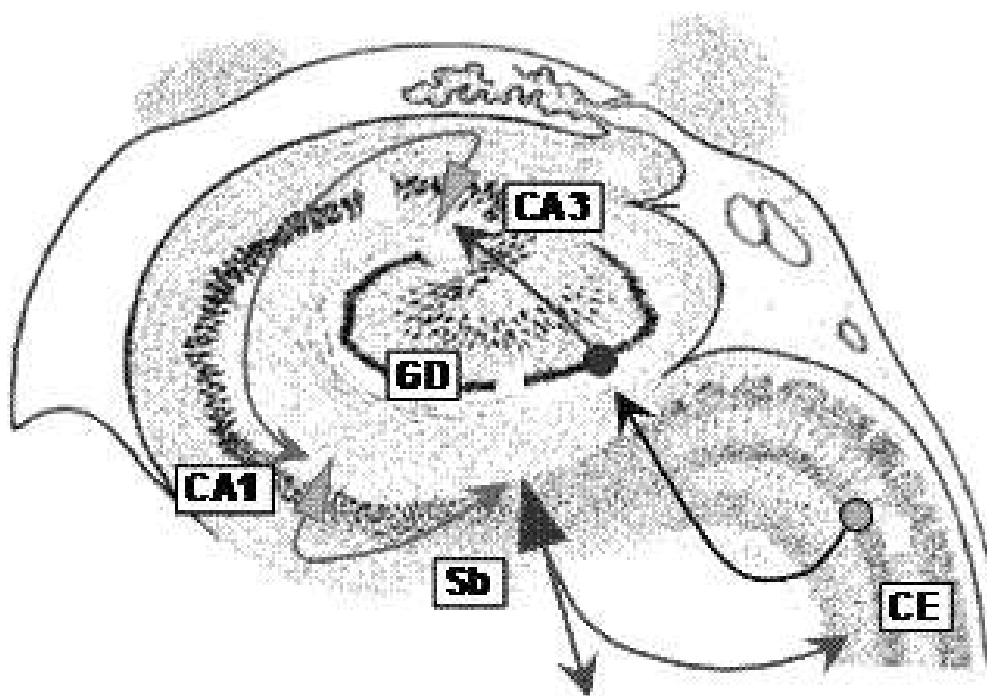


Figura 1. Desenho ilustrativo da formação hipocampal. Legenda: Córtex entorrinal (CE), subículo (Sb), Corno de Amon (CA), Giro Denteado (GD). As setas indicam vias de conexões nervosas (adaptado de Silva, 2010).

O hipocampo participa do sistema límbico. Sua função está relacionada com a memória e aprendizado, tendo papel integrativo e essencial em processos cognitivos e afetivos (Bear e cols., 2008).

A neurogênese é um processo de formação, diferenciação e migração de células nervosas funcionais a partir de uma célula progenitora. Descrito em 1913, por Santiago Ramón y Cajal, que acreditava que esse processo acontecia somente na fase embrionária dos mamíferos, sendo que essa idéia foi um dogma da neurociência por anos (Balu e Lucki, 2009).

Esse campo foi revolucionado com o surgimento de uma metodologia na qual usava-se a timidina tritiada [H3], um marcador de proliferação celular incorporado no DNA durante a fase S do ciclo celular que é detectado por autorradiografia, mostrando a produção de novos neurônios no giro denteado do hipocampo de ratos adultos (Altman e Das, 1965).

Na década de 90 ocorreu mais um salto no estudo da neurogênese com o surgimento da 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), um análogo sintético da timina, que também incorpora-se ao DNA na fase S da divisão celular, marcando as células em proliferação e pode ser revelado por técnicas de imuno-histoquímica e imunocitoquímica, permitindo uma análise morfológica ou uma quantificação estereológica das novas células (Gratzner, 1982).

A técnica de BrdU mostra-se sensível a proliferação celular na medida que o número de células recém formadas pode ser determinado em curto espaço de tempo, ou seja, aproximadamente 2h após a administração de BrdU. Nesse momento as células progenitoras sofreram somente uma divisão celular (Gage, 2000; Gross, 2000). Assim no século XX foi observada neurogênese

em mamíferos adultos, inclusive em pacientes humanos (Eriksson e cols., 1998).

A sobrevivência celular pode ser observada em torno de 4 semanas após a administração de BrdU, onde cerca de 50% das células sobrevivem. Nesse momento pode-se utilizar outros marcadores neuronais, como por exemplo, o antígeno nuclear neuronal (NeuN) ou glia como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para saber o fenótipo das células. Cerca de 75% a 80% são neurônios e 10% a 15% são células da glia e uma pequena porcentagem dessas células acabam por não expressar marcadores nem neuronais, nem gliais, tendo fenótipo indeterminado (van Praag e cols.,1999; Gage, 2000 e Gross, 2000).

Portanto, atualmente aceita-se a teoria de que a neurogênese acontece ao longo da vida adulta, com maior intensidade em locais específicos do SNC como na zona subventricular (SVZ) do ventrículo lateral e na zona subgranular (SGZ) do giro dentado do hipocampo. Com exceção dessas regiões a neurogênese é limitada, ou mesmo inexistente (Kempermann e Gage, 1999; Goh e cols., 2003; Alvarez-Buylla e Lim, 2004; Lie e cols., 2004).

Os neurônios que são gerados na região SVZ de forma continuamente, migram através do fluxo migratório rostral (RMS) para o bulbo olfatório, para se tornarem interneurônios (Figura 2), (Ming e Song, 2005).

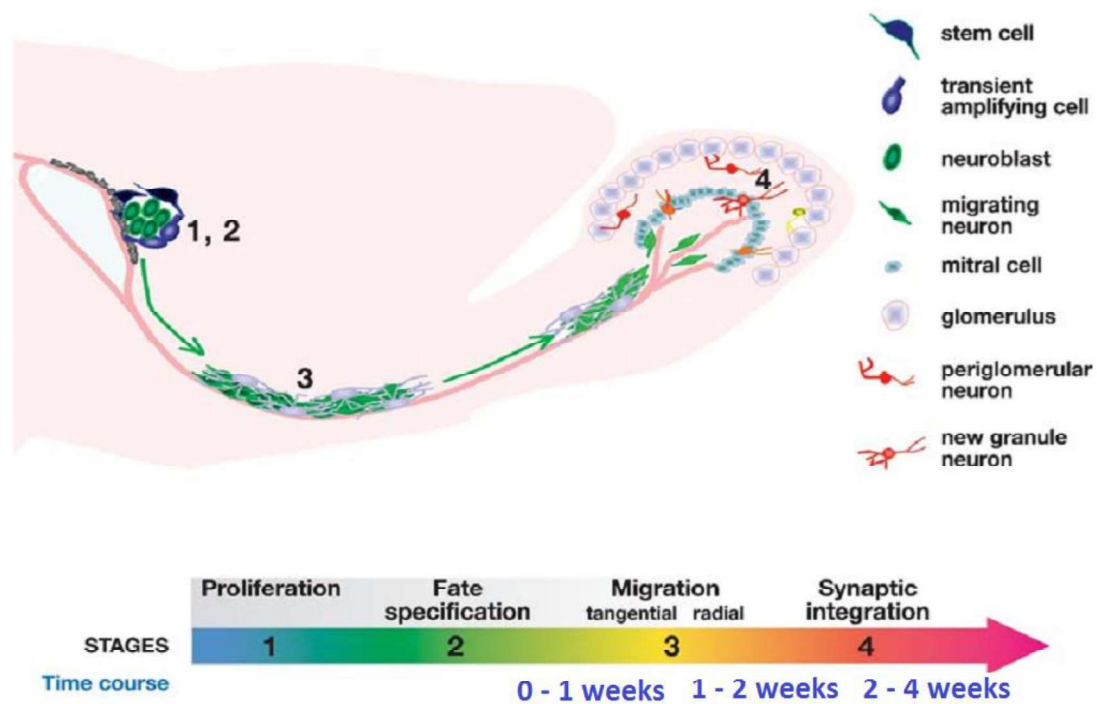


Figura 2. Neurogênese na zona subventricular, mostrando o fluxo migratório dos neurônios para o bulbo olfatório, onde tornam-se interneurônios. 1 representa o local de proliferação neuronal, 2 local onde ocorre a diferenciação da célula, 3 migração celular, 4 local onde os neurônios tornam-se interneurônios. A imagem também mostra o tempo em que as células permanecem nas fases 3 e 4, representado pelo *time course* (adaptado de Ming e Song, 2005).

No giro denteado do hipocampo novos neurônios granulares proliferam localmente, migram para o interior da camada granular e estendem seus axônios para a camada de células piramidais CA3, tornando-se neurônios típicos do local e acabam por integrar os circuitos ali presentes (Figura 3), (van Praag e cols., 1999; Ming e Song, 2005).

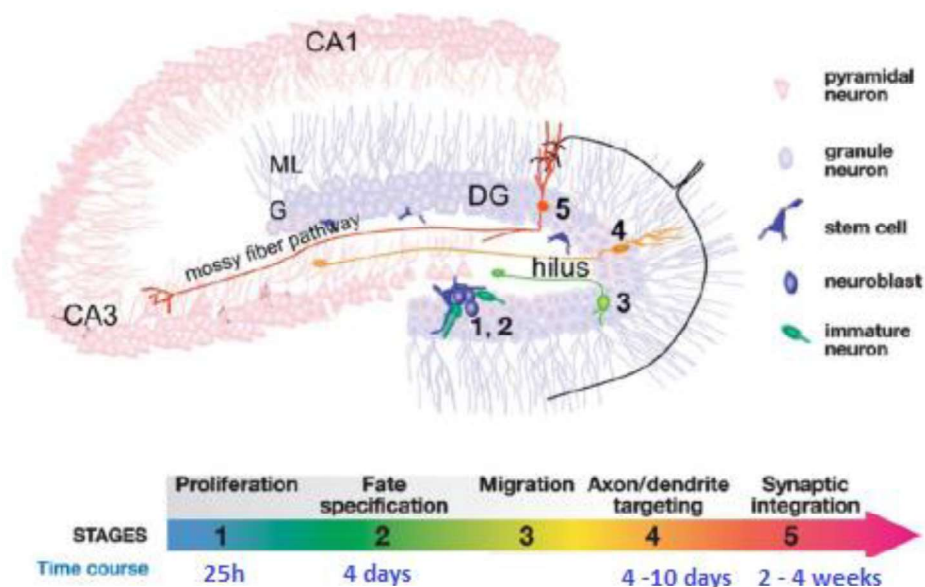


Figura 3. Neurogênese no giro denteado do Hipocampo, 1 representa o local de proliferação neuronal, 2 local onde ocorre a diferenciação da célula, 3 migração celular, 4 local onde se alojam dendritos e axônios e 5 local onde os neurônios fazem as interações sinápticas, a imagem também mostra o tempo em que as células passam nas determinadas fases, representado pelo *time course* (adaptado de Ming e Song, 2005).

Muitos fatores influenciam na proliferação celular na região do giro denteado do hipocampo, tanto fatores endógenos como fatores ambientais (Gould, 1999; Gould e cols., 2000).

Entre os estímulos endógenos que regulam a neurogênese hipocampal temos a ação dos neurotransmissores como serotonina, GABA, glutamato, noradrenalina e acetilcolina, fatores neurotróficos como fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), o fator de crescimento ligado a insulina (IGF-1) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), (Duman e cols., 2006).

Entre os fatores ambientais que influenciam a neurogênese estão: o exercício físico voluntário, o ambiente enriquecido, o aprendizado, o envelhecimento, e o estresse através da liberação de esteroides pelas adrenais (Gould e cols., 2000; Ming e Song, 2005; Grote e Hannan, 2007; Zhao e cols., 2008; Balu e Lucki, 2009).

Estudos mostraram que os neurotransmissores acetilcolina e noradrenalina são necessários para a proliferação e sobrevivência de novos neurônios. Um comprometimento da função colinérgica pode contribuir para o surgimento de déficit de memória e aprendizagem através de um decréscimo na produção de novos neurônios hipocampais. Já uma denervação noradrenérgica acarreta em uma redução na proliferação, mas não na sobrevivência e diferenciação das células progenitoras hipocampais (Grote e Hannan, 2007; Balu e Lucki, 2009).

O neurotransmissor GABA, também promove integração sináptica de novos neurônios no cérebro adulto e estudos demonstraram que esse neurotransmissor promove a diferenciação neuronal de células precursoras em cultura celular e o hipocampo recebe projeções gabaérgicas (Grote e Hannan, 2007; Zhao e cols., 2008).

Condições que induzem a expressão de BDNF, tais como exercício físico, restrição alimentar e enriquecimento ambiental aumentam a neurogênese na SGZ (Duman e Monteggia, 2006). Além disso essas intervenções aumentam também os níveis periféricos de fatores de crescimento como FGF-2, IGF-1 e VEGF em roedores (Grote e Hannan, 2007).

A idade, o estresse e algumas drogas de abuso como o álcool, por exemplo, prejudicam a neurogênese hipocampal. As células granulares do GD,

possuem receptores de glicocorticóides, deixando essas células vulneráveis a situação de estresse. Estudos mostram que altos níveis de glicocorticóides inibem a neurogênese (Balu e Lucki, 2009).

### **1.1.2 Células gliais – Astrócitos**

Glias ou neuroglias são o conjunto de células presentes no SNC junto aos neurônios, que fornecem um microambiente adequado para o funcionamento dos mesmos. Entre as células gliais do SNC encontramos: oligodentrócitos, astrócitos, células ependimárias e microglia (Rason e Kettenmann, 1990; Cahoy e cols.,2008).

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC, em forma de estrela com múltiplos processos irradiando do corpo celular. Apresentam feixes de filamentos intermediários constituídos principalmente pela proteína ácida fibrilar glial (GFAP), mas também por proteína ligadora de cálcio, S-100 beta e a enzima conversora de glutamato em glutamina, a glutamina sintetase. Recentemente foi identificado um novo marcador glial para a célula astrocitária, a enzima metabólica aldeído desidrogenase 1 (Aldh1L1), (Cahoy e cols.,2008).

Entre as múltiplas funções dos astrócitos no SNC, destaca-se a sustentação para os neurônios, a participação do controle da composição iônica e molecular do ambiente extracelular e resposta a diversos sinais químicos (Volterra e Meldolesi, 2005).

São classificados em dois grandes grupos baseado em sua morfologia, seu fenótipo antigênico e sua localização: astrócitos protoplasmáticos e os astrócitos fibrosos. Esses dois tipos também diferem em suas principais

funções realizadas dentro do SNC, bem como possuem respostas a estímulos diferentes (Barres, 2008).

Os astrócitos protoplasmáticos são encontrados na substância cinzenta e possuem processos que envolvem as sinapses e os vasos sanguíneos. Já os astrócitos fibrosos estão presentes na substância branca e entram em contato com os nódulos de Ranvier e com os vasos sanguíneos (Barres, 2008). Existem também outros subtipos de astrócitos, como os astrócitos velados, presentes no cerebelo, os astrócitos perivascularares e marginais, além dos astrócitos interlaminares (Cahoy e cols., 2008).

A partir da década de 1990 temos um novo conceito, de que a função cerebral é decorrente de uma atividade coordenada por uma rede composta pelos neurônios e células gliais. Surge então, o termo sinapse *tripartite* conceito estrutural e fisiológico baseado na presença de uma comunicação bidirecional entre os astrócitos e neurônios no ambiente sináptico, ou seja, os processos astrocíticos interagem com os neurônios ampliando o paradigma de interação neuronoglia (Figura 4), (Araque e Perea, 2004).

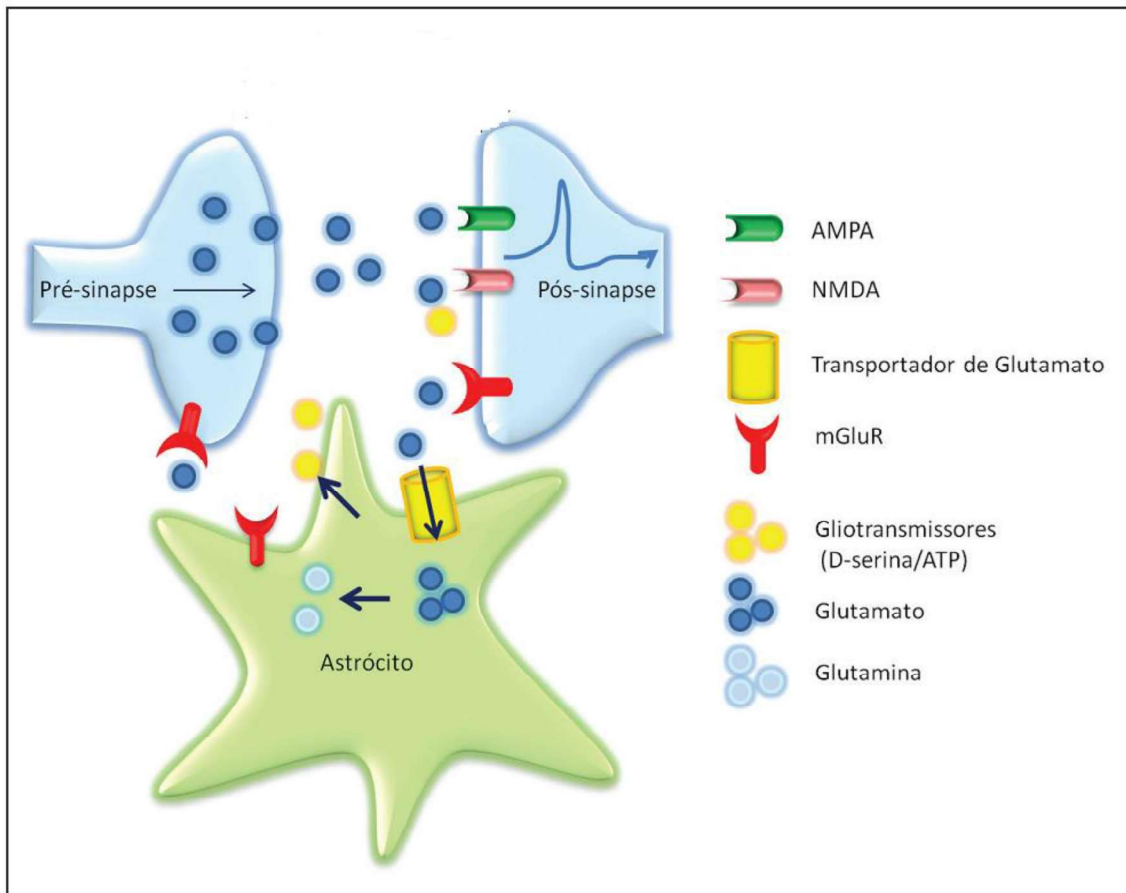


Figura 4. Sinapse *tripartite*: participação dos astrócitos na sinapses interagindo com os neurônios pré-sináptico e pós-sináptico (adaptado de Gomes e cols., 2013).

No processo de formação da memória, tem-se observado que a participação do astrócito na sinapse *tripartite* influencia a resposta que os neurônios darão a um estímulo excitatório. Que pode ser: desencadear um processo de pontencialização de longa duração (LTP), que acaba dando suporte à formação de memórias, ou o estímulo vai desencadear um processo de depressão de longa duração (LTD), que bloqueia a formação do estímulo e reduz a sensibilidade dos neurônios perante a uma nova estimulação do mesmo tipo (Robertson, 2002).

A sinapse tripartite glutamatérgica vem suportando a idéia de que o astrócito seria o componente fundamental que definiria se um estímulo vai ser lembrado ou não. O sinal excitatório recebido pelo neurônio pré-sináptico é repassado para o neurônio pós-sináptico, que transmite para outros neurônios. Entretanto o glutamato liberado pelo primeiro neurônio atinge também o astrócito, gerando uma resposta deste (Porcher, 2011).

Os astrócitos não produzem potenciais elétricos, mas processam a informação recebida e atuam sobre o neurônio pós-sináptico por meio de ondas do íon cálcio, ou seja, um fluxo de íons de cálcio dentro do astrócito. Essas ondas atravessam o astrócito, atingindo suas extremidades, onde estimulam a liberação de glutamato astrocitário, o qual se liga a receptores extra-sinápticos de ambos os neurônios. Com esse sinal, o astrócito pode determinar se os mesmos entrarão em um processo de potencialização ou depressão (Robertson, 2002; Gomes e cols., 2013).

Além disso, os astrócitos constituem a principal fonte de moléculas de matriz extracelular para os neurônios. Diversas moléculas de matriz extracelular sintetizadas por astrócitos apresentam efeito sinaptogênico como a trombospondina (TSP), hevina e glipican. Recentemente foi descrito que a citocina TGF- $\beta$ 1 (fator de transformação do crescimento beta 1) secretada por astrócitos do córtex cerebral de camundongos e humanos induz a formação de sinapses (Diniz e cols., 2012).

De outra forma os astrócitos são capazes de produzir sinais e fatores que influenciam na neurogênese. Esses fatores também são responsáveis por atuar sobre as células em diferenciação, finalizando seu destino, atuando em nichos celulares específicos e tornando-se ou célula glial ou neuronal. Nas

células granulares do GD do hipocampo, os fatores produzidos pelos astrócitos, atuam na diferenciação tornando a célula proliferante em um neurônio maduro (Horner e Palmer, 2003).

### **1.1.3 Apoptose**

A morte celular por apoptose é um processo vital e fundamental para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos corporais, que consiste na auto-destruição do material genético da célula e posterior fragmentação da mesma, formando corpos apoptóticos que posteriormente são fagocitados pelos macrófagos (Bredensen, 1996).

Esse evento celular é caracterizado por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas, incluindo as alterações nucleares como fragmentação do DNA, da membrana plasmática com “encolhimento” do citoplasma e externalização de moléculas internas como a fosfatidilserina (Wyllie e cols., 1980).

As alterações bioquímicas que acontecem durante esse processo envolvem classes específicas de moléculas como o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), a família das moléculas do Bcl-2 e as caspases.

Diversos estímulos podem desencadear a apoptose, sendo esses classificados em duas classes: estímulo mediado por receptor ou estímulo receptor independente. No primeiro caso temos o envolvimento da família das TNFR, tais como o receptor FAS (CD95, Apo-1) ou o receptor TRAIL, DR4 e DR5. Estes receptores tem um domínio sobre a morte celular, ou seja, quando um ligante se encaixa aos receptores, há formação de sinais que induzem a

apoptose através da ativação das caspases (Trauth e cols., 1989; Krammer, 1999; Peter e Krammer, 2003).

O outro mecanismo de estímulo não exige receptor. Substâncias citotóxicas para a célula promovem alterações na membrana da mitocôndria que por sua vez libera citocromo, que atua sobre a caspase (Liu e cols., 1996).

O principal evento para desencadear a apoptose é a ativação de enzimas chamadas caspases. Esta família de enzimas que possui aproximadamente 11 membros funcionalmente, pode ser dividida em dois grupos: desencadeador e executor dependendo da ordem na qual, são ativadas durante a apoptose. As caspases desencadeadoras incluem a caspase-8 e a caspase-9, outras como a caspase-3 e a caspase-6 agem como executoras. Como a maioria das proteases, as caspases existem nas células como pró-enzimas inativas e devem sofrer clivagem enzimática para tornarem-se ativas. A presença de caspases ativas clivadas indicam para as células estão sofrendo apoptose (De e cols., 1994, Robbins e Cotran, 2010).

O processo de apoptose tem uma fase inicial, onde, as caspases se tornam cataliticamente ativas e a fase de execução, onde, outras caspases iniciam a degradação de componentes celulares críticos (Robbins e Cotran, 2010).

#### **1.1.4 Consumo de etanol**

Em muitas partes do mundo o consumo de bebida alcoólica é um ato comum em encontros sociais, porém tal atitude leva a riscos severos, relacionados as propriedades tóxicas do álcool e também por a droga provocar dependência e tornar os indivíduos mais suscetíveis a doenças infecciosas

como tuberculose e pneumonia (WHO, 2014). Estudos indicam que o álcool é uma das drogas psicotrópicas de maior impacto negativo na saúde pública, segurança pessoal e estrutura social (Casswel e Thamarangsi, 2009).

No ano 2012, por todo mundo cerca de 3,3 milhões de mortes foram devido ao uso nocivo de álcool. Seu consumo aumenta o risco de desenvolvimento de mais de 200 doenças, entre elas a cirrose hepática, alguns tipos de câncer, entre outras (WHO, 2014).

No Brasil, segundo a Organização Mundial da Saúde o consumo de álcool tem aumentado gradativamente ao longo dos anos, tornando-se necessária a tomada de medidas, como produção de políticas públicas de intervenção para contornar essa realidade (WHO, 2014). Estudos mostram que a maioria dos usuários iniciam o consumo de álcool com idade inferior a 17 anos e também bebem quantidades alarmantes (Silveira e cols., 2011).

O impacto do uso de álcool na saúde da população brasileira é preocupante. Estima-se que 12% da população adulta satisfazem os critérios para história de vida com distúrbios pelo uso de álcool (Fonseca e cols., 2010; Silveira e cols., 2011).

O etanol quando consumido é absorvido no estômago e principalmente no intestino delgado. Após esse processo cerca de 80-90% é metabolizado pelo fígado, o restante é distribuído para os demais órgãos e 2 -10% do etanol absorvido é eliminado pela respiração ou excretado na urina. O metabolismo do etanol no fígado se dá por diferentes vias: pelo sistema álcool desidrogenase e pelo sistema microssomal de oxidação do etanol e em ambas as vias o objetivo é transformar o etanol em acetaldeído (Silva, 1997).

O sistema álcool desidrogenase provoca oxidação do etanol nos hepatócitos pela enzima álcool-desidrogenase, que é uma enzima induzível, tendo seus níveis aumentados com o consumo de álcool. O resultado dessa reação é a formação acetaldeído que por sua vez é convertido em acetado pela enzima aldeído-desidrogenase. Já se sabe que os sintomas de ressaca provocados pelo consumo de álcool são resultado de altas concentrações de acetaldeído no organismo (Silva, 1997; Campbell, 2006).

O outro mecanismo de metabolismo do álcool é o sistema microssomal, ativado principalmente quando os limites do consumo alcoólico superam um determinado limiar. As atividades desse sistema são desempenhadas pelo citocromo P450, também no hepatócito. A indução desta isoenzima leva a desequilíbrios metabólicos devido a geração de radicais livres, o que provoca hepatotoxicidade. O acetato produto final da metabolização pode ser convertido em acetil-CoA, ou em ácidos graxos, ou em corpos cetônicos, colesterol ou ainda lançado na corrente sanguínea para posterior oxidação (Mitchell e Herlong, 1986).

Tendo em vista a metabolização do álcool, conclui-se que seu consumo pode provocar gastrite, hepatite, pancreatite entre outras comorbidades. Quando consumido, a longo prazo, prejudica todos os órgãos, em especial fígado, pois este sofre uma sobrecarga ao metaboliza-lo, deixando de realizar suas outras atividades. A insuficiência hepática será quase uma certeza, além de deficiências nutricionais, distúrbios eletrolíticos e também o SNC será afetado (Campbell, 2006).

O álcool tem um efeito preferencial sobre as membranas celulares, podendo torná-las rígidas ao ponto de rompê-las, deixando a célula

desprotegida e provocando extravasamento do citoplasma, ou seja, destruindo a célula (Chin e Goldstein, 1977).

Os efeitos agudos do uso de álcool como alegria, euforia, entusiasmo são resultados da ação inibitória que o etanol provoca no sistema nervoso, agindo indiretamente sobre o sistema límbico, que tem papel fundamental na expressão das emoções e na atividade do sistema de recompensa do cérebro (Koob e Le Moal, 2001).

Muitos estudos examinaram os efeitos do etanol sobre receptores excitatórios e inibitórios do SNC, que podem levar a alterações sinápticas, promovendo uma comunicação neuronal alterada mediada pelos neurotransmissores acetilcolina, dopamina, serotonina, glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) entre outros, por ação direta e indireta (Wakita e cols., 2012; Santos e cols., 2013).

Alguns autores já mostraram que o etanol atua principalmente sobre os sistemas GABAérgicos e glutamatérgicos do SNC (Reynolds e Prasad, 1991; Aguayo e cols., 1994; Tatebayashi e cols., 1998; Fischer e cols., 2003). Assim acredita-se que o etanol atue sobre os neurotransmissores GABAérgicos (principal neurotransmissor inibitório) e também sobre os canais GABAérgicos potencializando sua ação, aumentando a probabilidade da abertura dos canais GABA e ampliando o tempo de abertura desses canais (Tatebayashi e cols., 1998).

O etanol também age sobre os canais e receptores excitatórios, ou glutamatérgicos, assim os sinais precoces de intoxicação incluem euforia, excitação, desinibição social, ataxia leve, rubor facial, taquicardia, midríase. Quando aumenta-se a quantidade de álcool ingerida passa-se a predominar

sinais de depressão do SNC que podem levar ao coma, hiporreflexia, depressão respiratória e hipotensão arterial (Mihalek e cols., 2001; Fischer e cols., 2003; Hanchar e cols, 2005).

Wakita e cols. (2012), mostraram que um dos principais alvos para a ação do etanol é a sinapse inibitória GABAérgica e que baixas concentrações de etanol podem potencializar a ativação de receptores GABAérgicos pré-sinápticos, mostrando uma alta sensibilidade dos receptores GABA pré-sinápticos pelo etanol.

A neurogênese é fortemente regulada pela genética e modulada por fatores ambientais. Alguns estudos mostram que uma única dose de álcool pode diminuir a proliferação celular em 40% no GD do hipocampo (Gomez e cols., 2015). O hipocampo, localizado no telencéfalo, é uma estrutura do sistema límbico e está envolvido em funções como aprendizagem e memória (Merry e Korsmeyer, 1997).

No GD de um adulto a célula pode proliferar-se em um ciclo de 25h, duplicando seu DNA na fase S da interfase celular em cerca de 9,5h. O álcool por sua vez inibe o número de células que entram na fase S. As células que conseguem realizar a divisão celular podem morrer por apoptose, migrar ou diferenciarem-se em neurônios ou glia, e a diferenciação celular leva aproximadamente de 2 a 4 semanas. Assim os efeitos do consumo do álcool sobre os circuitos do hipocampo levam algumas semanas para serem observados, além disso o álcool pode interferir na atividade dos fatores de crescimento que regulam a proliferação celular. O álcool inibe receptores de IGF-1, fator de crescimento importante para neurogênese e também para a

sobrevivência celular (Merry e Korsmeyer, 1997; Zhang e cols., 1998; Nixon e Crews 2002).

Pensando no consumo crônico de álcool, um estudo em 1980, constatou que o álcool levou a perda de 20 a 25% das células do giro denteado do hipocampo em ratos, um valor próximo ao que seria de esperar para a inibição contínua induzida pelo álcool da neurogênese no GD do hipocampo. Assim autores concluíram que a inibição de novos neurônios pode contribuir para a neurodegeneração associada ao consumo crônico de álcool (Walker e cols., 1980).

Levando em conta que o álcool é um fator estressor para o organismo e principalmente para o SNC, podemos pensar que a neurogênese pode ser afetada pelo estresse provocado pelo álcool ao ativar o eixo neuroendócrino hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA). Este eixo que responde ao estresse, ativa as glândulas supra-renais a secretar os hormônios esteroides como os glicocorticoides, que por sua vez podem estar envolvidos afetando de maneira negativa e indiretamente a neurogênese, já que o SNC tem poucos ou nenhum receptores específicos para a ação de glicocorticoides, porém estes interferem nos receptores de glutamato (Gould, 1999).

Observou-se também que o neurotransmissor serotonina está envolvido na neurogênese. Experimentos mostraram que uma lesão em neurônios que liberam serotonina, diminui a proliferação celular, principalmente no giro denteado do hipocampo e quando restaurado parcialmente a lesão a proliferação celular volta aos níveis normais (Gould, 1999).

O álcool provoca morte celular, o que no SNC é extremamente danoso, sabendo-se que a neurogênese também é prejudicada por essa droga. A morte

celular pode acontecer por dois processos básicos: a necrose e a apoptose. A necrose acontece quando os neurônios são danificados por trauma, ou lesão metabólica, envolve a morte simultânea de células adjacentes e o resultado final da necrose é a formação de um processo inflamatório. Já a morte celular por apoptose consiste na auto-destruição do material genético da célula e posterior fragmentação da mesma, formando corpos apoptóticos (Bredensen, 1996).

O álcool atua sobre as proteínas e enzimas que controlam o processo de apoptose, provocando um desequilíbrio na célula, podendo interferir também inibindo fatores de crescimento que mantêm as células em bom funcionamento (Merry e Korsmeyer, 1997; Zhang e cols., 1998).

A grande maioria dos estudos relacionando o consumo de álcool com seus efeitos deletérios ao SNC, mostram dados preocupantes em relação aos neurônios, porém eles não são as únicas células presentes no sistema nervoso, as células da glia, também podem ser afetadas por essa droga (Santos e cols., 2013).

Os astrócitos podem tornar-se reativos, após danos no SNC e expressam em quantidade elevada de GFAP, levando a alterações na morfologia e funcionamento destas células (Pekny e Nilsson, 2005).

O álcool além de afetar os neurônios pode também prejudicar o SNC atuando sobre os astrócitos, por exemplo, como citado anteriormente são células muito versáteis e são capazes de influenciar na atividade e sobrevivência dos neurônios.

### **1.1.5 Inalação da fumaça do cigarro**

O cigarro é um dos produtos de consumo mais vendidos no mundo, é produzido a partir de produtos da folha do tabaco, onde até 700 aditivos químicos podem ser utilizados na sua fabricação. A fumaça do cigarro está repleta de aproximadamente 4000 substâncias entre elas a acetona, o arsênio, o butano, o monóxido de carbono, o cianeto e também a nicotina substância tóxica psicoativa altamente viciante (Aliança de Controle ao Tabagismo, 2012).

A epidemia do tabaco é uma das maiores ameaças à saúde pública que o mundo já enfrentou, matando quase 6 milhões de pessoas por ano, mais de 5 milhões dessas mortes são resultados do uso direto do tabaco, enquanto que 600 mil são o resultado dos não-fumantes expostos a fumaça do cigarro (WHO, 2014).

No Brasil, muitos bilhões de reais são gastos no tratamento de pessoas com doenças relacionadas ao cigarro e o tabagismo é responsável por 13% das mortes no país (Aliança de Controle ao Tabagismo, 2012). Por isso algumas medidas de combate ao tabagismo foram adotadas como a lei nº12.546 de 14 de dezembro de 2011, que proíbe fumar em recintos coletivos fechados, privados ou públicos, de todo país, mostrando um avanço na política nacional de combate ao tabagismo, garantindo a proteção da população brasileira contra os danos à saúde decorrentes da exposição a fumaça do cigarro (Ministério da Saúde, 2011).

O tabagismo ativo é considerado a principal causa de morte evitável nos seres humanos. Existem inúmeras doenças relacionadas, causadas ou agravadas, pelo fumo e muitos delas são letais. Dos casos de câncer de

pulmão 90% ocorrem em tabagistas e doenças como o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC), são diretamente relacionados ao tabagismo (INCA, 2014; Aliança de Controle ao Tabagismo, 2012).

A fumaça do cigarro é composta por duas fases: a particulada e a gasosa. Entre os componentes da fase gasosa que produzem efeitos indesejáveis estão o monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio, amônia, nitrosamidas voláteis, cianeto de hidrogênio, compostos voláteis contendo enxofre, hidrocarbonetos voláteis, álcoois, aldeídos e cetonas. Já a fase particulada contém nicotina, água e alcatrão (Longenecker, 2002).

Durante a tragada, a fumaça passa pela boca e agride a sua mucosa, segue pela laringe, traquéia, onde paralisa temporariamente os cílios que limpam o muco e outras partículas invasoras do sistema respiratório. Posteriormente segue para os brônquios, indo em direção aos alvéolos. Atravessa as paredes dos vasos, penetrando na corrente sanguínea, distribuindo-se para a circulação sistêmica e chegando rapidamente ao cérebro entre 7 a 19 segundos. Esta rápida absorção é facilitada pelo grande número de capilares nas paredes dos alvéolos pulmonares (Takahashi, 1982).

Muitas substâncias presentes na fumaça do cigarro, como o alcatrão e o benzeno o tem potencial carcinogênico. A taxa de mortalidade por câncer em fumantes é maior em relação aos não fumantes. O tabagismo é responsável pela maioria dos casos de câncer de pulmão. Outros tipos de câncer também estão relacionados ao cigarro, como o de boca, laringe, faringe, esôfago, estômago, pâncreas, rim, ureter e bexiga (INCA, 2014).

A exposição direta a fumaça do cigarro leva a lesões e inflamação nas vias respiratórias, bem como aumenta os níveis de mediadores inflamatórios na circulação sanguínea. A exposição crônica leva a doenças graves no sistema respiratório, tais como bronquite crônica, enfisema pulmonar e exacerbação dos casos de asma (van Eeden e Hogg, 2002).

O monóxido de carbono presente na fumaça do cigarro tende a se acumular no sangue, limitando a capacidade do corpo de transportar oxigênio. Ele se liga a molécula de hemoglobina (Hb) no lugar do oxigênio e forma a carboxihemoglobina (COHb), levando há uma hipóxia tecidual, estimulando a eritropoese, com consequente elevação do hematócrito (Leopércio e Gigliotti, 2004).

A nicotina, metabólito alcaloide do tabaco ao entrar em contato com a glândula adrenal é capaz de causar alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, provocando um aumento significativo nos hormônios liberados por essa glândula, como por exemplo, a adrenalina, alterando assim o ritmo cardíaco, aumentando a pressão sanguínea e os batimentos cardíacos. Atua sobre o sistema cardiovascular através da estimulação da via sistema nervoso autônomo simpático (Mendelson e cols., 2008).

Alguns estudos já estão relacionando o tabagismo com o estado pré-diabético, onde a hiperglicemia seria um evento precoce entre os fumantes e pode ser reversível após o fim do tabagismo e também há uma relação ainda um pouco dúbia entre a dependência a nicotina e o pré-diabetes, sugerindo alterações no sistema de receptores de nicotina, levando a hiperglicemia (Aeschbacher e cols., 2014).

Assim como o álcool e demais drogas de abuso, a nicotina presente na fumaça do cigarro atua no sistema de recompensa do SNC, promovendo dependência. A nicotina aumenta as concentrações de dopamina e inibe a ação da enzima monoaminoxidase (MAO), responsável pela degradação da dopamina, aumentando ainda mais os efeitos reforçadores da nicotina, que age se ligando aos receptores colinérgicos nicotínicos, que são canais iônicos típicos, regulados por ligantes. Esses receptores são encontrados ao longo do SNC (Fowler e cols., 1996; Koob e Le Moal, 2001). Assim a nicotina torna-se responsável pela ação psicoativa do cigarro e por gerar dependência, portanto é considerada o agente farmacológico responsável pelos efeitos do tabaco no SNC. No entanto, estudos já comprovaram que não é só a nicotina que afeta o sistema nervoso, mas também muitos de seus metabolitos (Crooks e Dwoskin, 1997).

Os efeitos provocados pela nicotina e seus metabolitos no SNC são elevação do humor, excitação, aprendizagem e revitalização da memória (Le Novère e Changeux, 1995).

Um estudo realizado com ratas que receberam nicotina no final da gestação e no início do período pós-natal, exibiram menor quantidade de DNA total no encéfalo quando comparados aos controles. Esta diminuição reflete uma redução no número total de células e sugere que a nicotina inibe ou reduz o aumento no número de células que caracteriza a maturação encefálica (Dwyer e cols., 2008).

Mudanças neuroquímicas, como danos na migração, proliferação e diferenciação celular, além de alterações funcionais nos sistemas colinérgicos e catecolaminérgicos são observadas em ratos expostos à nicotina, sendo que

a exposição crônica a nicotina resulta na superexpressão de receptores para dopamina e noradrenalina, sugerindo que a nicotina prejudica a atividade sináptica (Eppolito e Smith, 2006).

Alguns autores estudando estresse oxidativo no SNC mostraram que muitas enzimas oxidativas são alteradas pela fumaça do cigarro, observando uma relação negativa, onde ocorre uma diminuição significativa na capacidade antioxidante, com altos níveis de peroxidação lipídica em todas as áreas do SNC, o que resulta em morte e dano celular (Anbarasi e cols., 2006, Manna e cols., 2006).

#### **1.1.6 Associação do etanol e fumaça do cigarro**

Álcool e o cigarro são as drogas lícitas mais consumidas no mundo, 90% dos indivíduos dependentes de álcool são fumantes e alcoolistas pesados fumam mais do que indivíduos não alcoolistas. Estudos já tem demonstrado que os alcoolistas são mais propensos ao uso de álcool e vice-versa (Meyerhoff e cols., 2006, Bobo e Husten, 2000).

Hoje existem cerca de mais de 2 bilhões de usuários de álcool e cerca de 1,3 bilhões de usuários de tabaco no mundo e o uso crônico e pesado dessas duas drogas representam aproximadamente 12% da taxa de mortalidade em todo mundo. (Thomas e cols., 2014, WHO, 2002).

Geralmente o consumo dessas drogas começam na adolescência e um início precoce de fumar e beber é um forte indicativo de dependência química (Johnston e cols. 2001).

Na área da microbiologia Thomas e cols. (2014) mostraram que essa relação de álcool mais tabaco usado concomitante e crônico é prejudicial a mucosa oral dos indivíduos, alterando o microambiente e deixando-os mais suscetíveis a infecções e doenças na cavidade oral.

Luhar e cols. (2013) estudaram como o tabagismo e o alcoolismo poderiam interagir em relação ao volume cerebral e o desempenho cognitivo e observaram que os indivíduos que fumavam e bebiam possuíam anormalidades volumétricas consideráveis em relação aos indivíduos que não faziam uso das drogas. Os indivíduos que faziam uso de cigarro e de álcool desempenharam pior função nos testes cognitivos e de memória baseada em testes visuais.

Outros estudos também retratam uma relação negativa da associação dessas drogas no SNC. Na idade adulta, a nicotina e o etanol podem interagir de modo que uma droga pode potencializar ou neutralizar os efeitos da outra. Na adolescência onde o uso das duas também é frequente, o estudo mostra novamente efeitos danosos. Abreu-Villaça e cols. (2007) relatam em um estudo feito com animais, que a exposição dupla das drogas traz efeitos negativos para memória e aprendizado, porém ao cessar o consumo esses efeitos podem ser revertidos.

A associação entre o álcool e a nicotina prova que, em camundongos, ocorre uma redução na neurogênese e um aumento da apoptose hipocampal, associados ao déficit de memória e aprendizado (Jang e cols., 2002). No entanto a literatura é escassa em estudos analisando as propriedades do álcool e da fumaça do cigarro em relação ao SNC.

## Referências bibliográficas

Abreu-Villaça Y, Medeiros AH, Lima CS, Faria FP, Filgueiras CC, Manhães AC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. *Behav Brain Res.* 2007; 181(1):136-46.

Aeschbacher S, Schoen T, Clair C, Schillinger CP, Schönenberger S, Risch MRL, et al., Association of smoking and nicotine dependence with pre-diabetes in young and healthy adults. *Swiss Med Wkly.* 2014;144:14019.

Aguayo LG, Pancetti FC, Klein RL, Harris RA. Differential effects of GABAergic ligands in mouse and rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1994;647:97-105.

Agulhon C, Sun MY, Murphy T, Myers T, Lauderdale K, Fiocco TA. Calcium Signaling and Gliotransmission in Normal vs. Reactive Astrocytes. *Front Pharmacol.* 2012;3:1-16.

Aliança de Controle ao tabagismo. Saúde. São Paulo: Aliança de Controle ao tabagismo; 2012 [capturado em 2014 Ago 10]. Disponível em: <http://actbr.org.br/tabagismo/saude.asp>

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124:319–335.

Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 2004;41:683–86.

Anbarasi K, Vani G, Balakrishna K, Shymala Devi CS. Effect of bacoside A on Brain antioxidante status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci.* 2006;78:1378-1384.

Araque A, Perea G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia.* 2004;47(3):241-8.

Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neuroscie Biobehavi Rev.* 2009;33:232–252.

Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 2008 Nov 6; 60(3):430-440.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso.* 3th ed. Porto Alegre: Artmed; 2008.

Bobo JK, Husten C. Sociocultural influences on smoking and drinking. *Alcohol Res Health.* 2000;24:225–232.

Borner C. Bcl-2 protein family: Sensors and check-points for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 2003;39:615–647.

Bredensen DE. Keeping neurons alive: The molecular control of apoptosis (Part 1). *Neuroscientist.* 1996;2:181-190.

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, *et al.* A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J neurosci.* 2008;28(1):264-78.

Campbell MK. *Bioquímica.* 3th ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.

Casswell SE, Thamarangsi T. Reducing harm from alcohol: call to action. *Lancet.* 2009; 373: 2247–2257.

Chin JH, Goldstein DB. Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spin-labeled erythrocyte and brain membranes. *Mol Pharmacol.* 1977;13:435–441.

Crooks PA, Dwoskin LP. Contribution of CNS nicotine metabolites to the neuropharmacological effects of nicotine and tobacco smoking. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(7):743-53.

De A, Boyyadjieva NI, Pastoricic M, Reddy B, Sartar DK. Cyclic AMP and ethanol interact to control apoptosis and differentiation in hypothalamic B-endorphin neurons. *J Biol Chem.* 1994;269: 26697-26705.

Diniz LP, Almeida JC, Tortelli V, Vargas Lopes C, Setti-Perdigão P, Stipursky J, *et al.* Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor  $\beta$  signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. *J Biol. Chem.* 2012;287(49);41432-45.

Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2006;59:1116–1127.

Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine in brain development. *Birth Defects Research, Part C: Embryo Today- Reviews.* 2008;84(1):30-44.

Eppolito AK, Smith RF. Long-term behavioral and developmental consequences of pre- and perinatal nicotine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;85(4):835-841.

Eriksson OS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4:1313-1317.

Fischer W, Franke H, Illes P. Effects of acute ethanol on the Ca<sup>2+</sup> response to AMPA in cultured rat cortical GABAergic nonpyramidal neurons. *Alcohol.* 2003;38:394–399.

Fleming M, Mihic SJ, Harris RA. Drugs acting on the central nervous system *In*: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's Pharmacology, 11th. San Diego. The McGraw-Hill, 2005.

Fonseca AM, Galduroz JCF, Noto AR, Carlini ELA. Comparison between two household surveys on psychotropic drug use in Brazil: 2001 and 2004. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2010;15: 663–670.

Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ. Brain monoamine oxidase A inhibition in cigarette smokers. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:14065-14069.

Gage F. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287:1433–1438.

Goh EL, Ma D, Ming GL, Song H. Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous system. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003;12:671–79.

Gomes FCA, Tortelli VP, Diniz L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estudos avançados*. 2013;27(77):61-84.

Gomez R, Schneider RJ, Quinteros D, Santos CF, Bandiera S, Thiesen FV, Coitinho AS, Fernandes MD, Wieczorek MG. Effect of Alcohol and Tobacco Smoke on Long-Term Memory and Cell Proliferation in the Hippocampus of Rats. *Nicotine Tob Res*. 2015 Mar 5. pii: ntv051

Gould E. Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21(Suppl. 2):46–51.

Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N. Regulation of Hippocampal Neurogenesis in Adulthood. *Biol Psychiatry*. 2000;48:715-720.

Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 1982;218:474–75.

Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Neurosci*. 2000;1:67–73.

Grote HE, Hannan AJ. Regulators of Adult Neurogenesis in the Healthy and Diseased Brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34(5-6):533–545.

Hanchar HJ, Dodson PD, Olsen RW, Otis TS, Wallner M. Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptor activity. *Nat Neurosci*. 2005;8:339–345.

Horner PJ, Palmer TD. New roles for astrocytes: The nightlife of an 'astrocyte'. *La vida loca! Trends in Neurosci*. 2003;26(11):597-603.

INCA -Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Pulmão. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2014 [capturado em 2014 Ago 12]. Disponível

em:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao/definicao>

Jang MH, Shin C, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, et al. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport*. 2002;13(12):1509-13.

Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, et al. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport*. 2002;13(12):1509-13.

Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG. National survey results on drug use from the monitoring the future study, 1975–2000. NIH Publication Number 01-4924. Bethesda, MD: Department of Health and Human Services; 2001. Site disponível em:  
[http://www.monitoringthefuture.org/pubs/monographs/vol1\\_2000.pdf](http://www.monitoringthefuture.org/pubs/monographs/vol1_2000.pdf)

Kempermann G, Gage FH. New nerve cells for the adult brain. *Sci Am*. 1999;280:48–53.

Koob GF, Le Moal M. Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*. 2001;24(2):97-129.

Krammer PH. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*. 1999;71:163–209.

Le Novère NL, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: An example of multi-gene family in excitable cells. *J Mol Evol*. 1995;40:155-172.

Leopércio W, Gigliotti A. Tabagismo e suas peculiaridades durante a gestação: uma revisão crítica. *J bras pneumol*. 2004;30(2):176-185.

Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:399–421.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptosis program in cell-free extracts: requirement of dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86:147–157.

Longenecker GL. *Drogas: ações e reações*. São Paulo. Market Books, 2002.

Luhar RB, Sawyer K, Gravitz Z, Ruiz SM, Oscar-Berman M. Brain volumes and neuropsychological performance are related to current smoking and alcoholism history. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:1767–1784.

Manna SK, Rangasamy T, Wise K, Sarkar S, Shishodia S, Biswal S, et al. Long term environmental tobacco smoke activates nuclear transcription factor-kappa

B, activador protein-1, and stress responsive kinases in mouse brain. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71(11):1602-1609.

Mendelson JH, Goletiani N, Sholar MB, Siegel AJ, Mello NK. Effects of smoking successive low- and high-nicotine cigarettes on hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and mood in men. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Mar;33(4):749-60.

Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1997;20: 245-267.

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: 253–264.

Mihalek RM, Bowers BJ, Wehner JM, Kralic JE, VanDoren MJ, Morrow AL, *et al.* GABA receptor subunit knockout mice have multiple defects in behavioral responses to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25(12):1708–1718.

Ming G, Song H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:223-250.

Ministério da Saúde; Lei. Brasília. 2011 [capturado em 2014 Ago 10]. Disponível em: [http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6716&Itemid=290](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=6716&Itemid=290)

Mitchell MC, Herlong HF. Alcohol and nutrition: caloric value, bioenergetics and relationship to liver damage. *Ann Rev Nutr.* 1986(6):457-474.

Nixon K, Crews FT. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry.* 2002;83(5):1087–1093.

Oliveira-da-Silva A, Vieira FB, Cristina-Rodrigues F, Filgueiras CC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int J Dev Neurosci.* 2009;27(6):539-48.

Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 2005;50(4):427–434.

Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Different.* 2003;10:26–35.

Porcher C, Hatchett C, Longbottom RE, McAinch K, Sihra TS, Moss SJ, *et al.* Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J Biol. Chem.* 2011;286(24):21667-77.

Rason BR, Kettenmann, H. Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. *Glia*. 1990;3(4): 258-66.

Reynolds JN, Prasad A. Ethanol enhance GABAA receptor-activated chloride currents in chick cerebral cortical neurons. *Brain Res*. 1991;564:138–142.

Robertson, JM. The Astrocentric Hypothesis: proposed role of astrocytes in consciousness and memory formation. *J Physiol*. 2002;96:251–255.

Robbins, Cotran. *Patologia. Bases Patológicas das Doenças*. 8<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.

Santos LEC, Silveira GA, Costa VDC, Batista AG, Madureira AP, Rodrigues AM, et al. Alcohol Abuse Promotes Changes in Non-Synaptic Epileptiform Activity with Concomitant Expression Changes in Cotransporters and Glial Cells. *Plos one*. 2013 Nov;8(11):1-10.

Silva, AV. *O Hipocampo normal e patológico [Material Didático]*. São Paulo; 2010 [capturado em 2014 Nov 30]. Disponível em: [http://www.lasse.med.br/mat\\_didatico/lasse1/textos/alexandre01.html](http://www.lasse.med.br/mat_didatico/lasse1/textos/alexandre01.html)

Silva, P. *Farmacologia*. São Paulo: Manole; 1997.

Silveira CM, Viana MC, Siu ER, de Andrade AG, Anthony JC, Andrade LH. (2011) Sociodemographic correlates of transitions from alcohol use to disorders and remission in the Sao Paulo megacity mental health survey, Brazil. *Alcohol Alcohol*. 2011;6(3): 324–332.

Stedman RL, Miller RL, Lakritz L, Chamberlain WJ. Method for concentrating polynuclear aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate. *Chem Ind*. 1968;12:394-395.

Storr CL, Cheng H, Alonso J, Angermeyer M, Bruffaerts R, de Girolamo G, E, et al. Smoking estimates from around the world: data from the first 17 participating countries in the World Mental Health Survey Consortium. *Tob Control*. 2010;19(1):65-74.

Takahashi, M. *Atlas colorido de Citologia do Câncer*. 2th ed. São Paulo: Manóle, 1982.

Tatebayashi H, Motomura H, Narahashi T. Alcohol modulation of single GABA receptor-channel kinetics. *Neuro Report*. 1998;9:1769–1775.

Thomas A, Gleber-Netto F, Fernandes G, Amorim M, Barbosa L, Francisco A, et al. Alcohol and tobacco consumption affects bacterial richness in oral cavity mucosa biofilms. *BMC Microbiol*. 2014;14(1):250.

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, *et al.* Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. 1989 245:301–305.

van Praag H, Christie B, Sejnowski T, Gage F. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:13427–13431.

van Eeden SF, Hogg JC. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: the importance of bone-marrow stimulation. *J Toxicol Environ Health*. 2002;A65:1597–613.

Virani AD, Bezchlibnyk-Butler KZ, Jefries JJ. *Clinical Handbook of psychotropic drugs*. 18<sup>a</sup> ed. New York. Hogrefe & Huber Publishers, 2009.

Volterra A, Meldolesi, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Ver Neurosci*. 2005;6(8);626-40.

Wakita M, Shin MC, Iwata S, Nonaka K, Akaike N. Effects of ethanol on GABA(A) receptors in GABAergic and glutamatergic presynaptic nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341:809–819.

Walker DW, Barnes DE, Zornetzer SF, Hunter BE, Kubanis P. Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. *Science*. 1980 Aug; 209(4457):711–713.

WHO calls on governments to do more to prevent alcohol-related deaths and diseases. Geneva: World Health Organization; 2014 [capturado em 2014 Ago 12]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/alcohol-related-deaths-prevention/en/>>

WHO - Substance Abuse, alcohol Brazil. Geneva: World Health Organization; 2014 [capturado em 2014 Ago 12]. Disponível em: [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/profiles/bra.pdf?ua=1](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/profiles/bra.pdf?ua=1)

WHO -Substance Abuse, Global Burden of Disease. Geneva: World Health Organization; 2002 [capturado 2014 Ago 12]. Disponível em: [http://www.who.int/substance\\_abuse/facts/global\\_burden](http://www.who.int/substance_abuse/facts/global_burden).

WHO -Tabaco. Geneva: World Health Organization; 2014 [capturado em 2014 Ago 12]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251–306.

Zerning G, Saria A, Kurz M, O'Malley SS. Handbook of Alcoholism. Boston. CRC Press: Boca Raton, FL., 2000. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/119971968/Zernig-G-Handbook-of-Alcoholism>.

Zhang FX, Rubin R, Rooney TA. Ethanol promotes apoptosis of rat cerebellar granule cells by interference with IGF-I signaling. *J Neurochem*. 1998;71:196-204.

Zhao C, Deng W, Gage F. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*. 2008;132:645–660.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da associação do etanol e da fumaça do cigarro nas células do giro denteado hipocampal de ratos Wistar machos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a apoptose no giro denteado do hipocampo em ratos Wistar machos, expostos cronicamente ao etanol, à fumaça do cigarro e a associação destas drogas;
- Avaliar as células gliais do giro denteado do hipocampo em ratos Wistar machos, expostos cronicamente ao etanol, à fumaça do cigarro e a associação destas drogas em relação a densidade óptica da proteína ácida fibrilar glial.

### 3. Artigo científico

## EFFECT OF ALCOHOL AND TOBACCO SMOKE IN THE HYPOCAMPAL DENTATE GYRUS OF RATS

<sup>1</sup>Huf, F., <sup>2</sup>Bandiera, S., <sup>1</sup>Bresolin, J. V., <sup>1</sup>Galli, G. S., <sup>1</sup>Peixoto, J., <sup>1</sup>Piagette, T.,  
<sup>1</sup>Santos, C. F., <sup>2</sup>Schneider, R., <sup>3</sup>Müller, C. B., <sup>1</sup>Gea, L., Reiter, K. C., Meurer, R.  
T., <sup>2</sup>Gomez, R., <sup>1</sup>Fernandes, M.C.

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Patologia/ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

<sup>2</sup>Laboratório de Álcool e Tabaco, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, ICBS/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### Abstract

Although the extensive harm that alcohol and tobacco cause on human health is already known, these are still the most consumed licit drugs worldwide. Alcohol acts on the central nervous system (CNS) by affecting neurogenesis and cellular apoptosis, besides also possibly acting on glial cells. In turn, tobacco's main active principle, nicotine, causes alterations in synapses. However, little is known about the effects of these drugs on the CNS when they are used in association, particularly regarding cigarette smoke instead of only nicotine. This study aims to assess apoptosis and alterations in glial cells in animals exposed to ethanol and cigarette smoke, as well as the association of these drugs. The sample comprised 40 adult male Wistar rats divided into four groups: control group (CTR), alcohol group (ALC), tobacco group (TOB), and alcohol and tobacco group (ALCTOB), which received alcohol and were

exposed to cigarette smoke. The immunohistochemical technique for caspase-3 and anti-fibrillary acidic protein (GFAP) was used in cuts of the hippocampal dentate gyrus of these animals. Quantification was performed by counting the cells in apoptosis and optical densitometry (OD) of the GFAP-positive cells. Regarding apoptosis, it was found that the group TOB had a statistically significantly greater number of stained cells compared to CTR, while group ALCTOB also showed this significant relation when compared to CTR and ALC. For glial GFAP, significantly lower OD was observed in the groups ALC, TOB, and ALCTOB compared to CTR. The results showed the action of the oxidative stress caused by cigarette smoke, which leads to cellular death through apoptosis, and that the drugs affect glial cells, thus making the CNS more fragile.

Keywords: Ethanol, tobacco, apoptosis, glial cells.

## **Introduction**

Alcohol and tobacco are the most consumed licit drugs worldwide. In 2012, about 3.3 million deaths were attributed to harmful alcohol consumption (Casswel and Thamarangsi, 2009; WHO 2014), while over 5 million people die a year due to direct tobacco consumption, besides 600 thousand non-smokers exposed to cigarette smoke (WHO, 2014). There is a close alcohol/tobacco relationship, in which the large majority of alcoholists are also smokers and vice-versa (Casswel and Thamarangsi, 2009; WHO 2014).

Alcoholism is a chronic disease that causes irreversible damage to health and is involved in severe liver diseases, besides causing gastrointestinal,

kidney, and cardiovascular diseases (Zernig *et al.*, 2000; Fleming *et al.*, 2005). Alcohol acts on the central nervous system (CNS), particularly on the GABAergic and glutamatergic systems (Reynolds and Prasad, 1991; Aguayo *et al.*, 1994; Tatebayashi *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2003). It is a depressor with sedative and anxiolytic effects that leads to motor incoordination, slower reaction times, disinhibition, relaxation, euphoria, agitation, and cognitive and memory deficits (Virani *et al.*, 2009). Alcohol also impacts cellular neurogenesis and prevents the cells from entering the S phase of cell division. It impacts the activity of the growth factors that regulate cell proliferation by inhibiting IGF-I receptors, an important growth factor for neurogenesis and cell survival (Merry and Korsmeyer, 1997, Zhang *et al.*, 1998, Nixon and Crews 2002). Since alcohol is a stressor of the CNS, its chronic use can be associated to CNS degeneration (Walker *et al.*, 1980). Moreover, it is also able to initiate cell death through apoptosis by acting on the proteins and enzymes that control this process (Merry and Korsmeyer, 1997; Zhang *et al.*, 1998), and to cause functional alterations in glial cells, mainly astrocytes (Agulhon *et al.*, 2012, Santos *et al.*, 2013).

Smoking, in turn, is related to countless diseases, many of which lethal, such as lung cancer, heart attack, and stroke (INCA, Aliança de Controle ao Tabagismo, 2012). Direct exposition to cigarette smoke leads to lesions in the airways and increases the levels of inflammatory mediators in the blood stream (van Eeden and Hogg, 2002). Nicotine and its metabolites, present in cigarette smoke, are responsible for the cigarette's psychoactive action and for causing addiction (Crooks and Dwoskin, 1997). Neurochemical changes, such as damages in cell migration, proliferation, and differentiation, besides functional

alterations in the cholinergic and catecholaminergic systems, are observed in rats exposed to nicotine. Chronic exposition to nicotine results in the overexpression of receptors for dopamine and noradrenaline, which suggests that nicotine impairs synaptic activity (Eppolito and Smith, 2006).

Nevertheless, little is known about the effects of associating these drugs on the CNS, even if it is known that cigarette smoke contains other substances besides nicotine that can be harmful to the CNS. This study aims to assess the effects of the drugs in separate and in association on glial cells and hippocampal apoptosis in rats.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

The sample comprised 40 adult male Wistar rats weighing between 250 and 300g from the local colony of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. The animals were housed in polypropylene boxes (33x17x40 cm) under 12/12 photoperiod with temperature ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and humidity control. Throughout the trial, the animals had free access to water and food, except for 2h in the morning and 2h in the afternoon, when they were placed in airtight chambers with constant air flow for the exposition.

The animals were divided into four groups (n=10/group). Group Control (CTR) received 2 g/kg 8% glucose solution per gavage, while group Alcohol (ALC) received 2 g/kg (20% w/v) 95% ethanol in a 5% glucose solution per gavage. Both groups were immediately exposed in a controlled-flow chamber with room air circulation. Group Tobacco (TOB) received the same glucose

solution as group CTR, however, it was exposed to the smoke from the burning of 12 cigarette (Marlboro Red, Philip Morris) per day in the controlled-flow chamber with smoke-filled air circulation. Finally, group Alcohol and Tobacco (ALCTOB) received an alcoholic solution as group ALC and was exposed to cigarette smoke as group TOB.

Over 57 days, the animals underwent exposition, receiving the solution through gavage and then being immediately placed in the airtight chambers with constant air flow of 10 L/min, at a maximum of five animals per chamber according to their groups. In the morning, the animals in groups TOB and ALCTOB were subjected to the smoke from six cigarettes with 10 min intervals between each cigarette for air circulation. Next, the animals were removed from the chambers, where they remained for approximately 2h, and placed in their home boxes. The same procedure was repeated in the afternoon. Thus, the animals underwent two gavages and were exposed to the smoke of 12 cigarettes per day.

On the 58th day, the animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine (100 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) and, after showing signs and symptoms of anesthesia, were euthanized through transcardial perfusion.

In this process, the animal's organs are pre-fixated with a 15 min lavage with 0.9% saline (200 mL) followed by pre-fixation with 4% buffered paraformaldehyde for 40 min (400 mL). After this process, the animals' brains were removed and stored in recipients containing 4% buffered paraformaldehyde, 10 times the volume of the tissue, for 24h.

All procedures performed with the animals were approved by the Committee of Animal Research Ethics of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre under protocol 111/13.

### **Slide Preparation**

After being removed from the 4% paraformaldehyde, the brains were placed in a 70% alcohol solution for further 24h, after which they were embedded in paraffin (Easypath). The paraffin blocks were sliced with 5  $\mu\text{m}$  thickness in a microtome (Leica RM2255) and the region chosen for analysis was the hippocampal dentate gyrus according to the coordinates by Paxinos and Watson (2005) (Bregma -2.92mm to -4.68mm). A few slides were made from each animal, each containing three sections placed alternately on the slide.

### **Immunohistochemistry**

The immunohistochemical technique was carried out using the GFAP and caspase-3 antibodies. The sectioned slides were prepared for this technique through deparaffinization in an oven at 70°C and then immersion in xylol (two baths for 2 min each), absolute ethanol (three baths of 2 min each), and distilled water.

The apoptosis staining kit (SignalStain® Cleaved Caspase-3) was used for caspase-3 staining, with some modifications: The antigenic recovery was performed in sodium citrate (pH 6.0) around 92°C followed by blocking endogenous peroxidase in a 5% hydrogen peroxide 30V solution in methanol

and blocking the unspecific bonds with 1% BSA (fetal bovine serum in PBS Triton X-100, 0.05%). At the end of this technique, counterstaining with hematoxylin (Merck®) was carried out. Three slides from each animal were used for this antibody.

The material was quantified by counting the stained cells in the granular region of the hippocampal dentate gyrus using an optical microscope (Olympus® BX40, 40x). Three different analyzers were employed and the final result was the average of their counts. The number of cells in apoptosis for each animal is simply the sum of the stained cells in the nine sections.

For the immunohistochemical analysis for the GFAP antibody, initially the endogenous peroxidase was blocked in 5% hydrogen peroxide 30V in methanol followed by blocking the unspecific bounds with 1% BSA (fetal bovine serum in PBS Triton X-100, 0.05%) for 1h. The primary antibody used was GFAP monoclonal mouse anti-human 1:500 (glial fibrillary acidic Protein – Clone: 6F2 – Dako®) overnight at 4°C. After 1h at room temperature and lavage in PBS-TX, the antibody was detected using the indirect immunoperoxidase method with the Advance HRP Kit (Dako®) at room temperature for 40 min, followed by lavage in PBS-TX, developing with 0.06% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma Aldrich®) and 1% hydrogen peroxide 30V for 5 min. Immediately after the slides were developed, they underwent dehydration in ethanol at different concentrations (70, 90, and 100% for 2 min). Finally, Entellan (Merck®) and a coverslip were used.

Three slides were used per animal and one slide was used as negative control, which had no primary antibody.

## **Optical Densitometry (OD)**

The immunoreactivity of the antibody GFAP was quantified through OD analysis using an Olympus® BX 40 microscope coupled to a computer with the software Image Pro Plus® 6.3 (Media Cybernetics).

One image of each dentate gyrus was captured per section, which were converted into grayscale images. In order to measure OD, an area of interest (AOI) corresponding to the dentate gyrus was delimited in each image. The final OD value corresponds to the average of the values obtained in the 18 images subtracted from the OD value in the respective negative control, as described by Xavier *et al.* (2005).

## **Statistical Analyses**

The results obtained both for apoptosis and OD for GFAP were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni test, in which  $p < 0.05$  represents statistically significant results, with a 95% confidence interval.

## **Results**

### **Apoptotic Cells in the Hippocampal Dentate Gyrus**

The cells stained using the immunohistochemical technique were counted and the values found for the groups are described in Figure 1.

Relatively lower values can be seen in groups CTR and ALC, with no statistically significant differences between them. For the group TOB, the value of this parameter is higher than in groups CTR and ALC, although not significantly so.

The group ALCTOB had a significantly higher ( $p < 0.001$ ) number of cells in apoptosis compared with CTR and ALC. Table 1 shows the data found, while Figure 2 shows a hippocampal dentate gyrus section with immunoreactive cells for caspase-3.

### **GFAP Expression by Astrocytes**

GFAP expression by astroglia was quantified using OD and is shown in Figure 3.

The figure represents the optical density of the tissue analyzed, which showed that the group ALC has significantly lower optical density compared to CTR, i.e., it has lower GFAP expression. The same is true for the group TOB.

When the results for the group ALCTOB are observed, values similar to those for ALC and significantly lower ( $p < 0.001$ ) than CTR and TOB are found. Table 2 also summarizes the data found, while Figure 4 shows the GFAP-reactive hippocampal dentate gyrus sections.

### **Discussion**

Cell death through apoptosis is characterized by a series of morphological and biochemical alterations that involve mainly proteins called caspases, which initiate the process (Borner, 2003). There are several members in the family of the caspases, some of which exist in cells as inactive pro-enzymes and must undergo enzymatic cleavage to become active. The presence of active cleaved caspases is a marker for cells undergoing apoptosis (De *et al.*, 1994).

Under the conditions studied, no differences were found in the number of cells in apoptosis between the groups CTR and ALC. A study carried out in adolescent male and female mice exposed daily to nicotine in drinking water and intraperitoneal injections every other day showed that ethanol caused a great number of cells in apoptosis in the hippocampal dentate gyrus, thus evidencing the drugs' neurotoxicity (Oliveira-da-Silva *et al.*, 2009).

The higher number of apoptotic cells with drug use can be partially explained by a mechanism associated with the NMDA (N-metil-D-aspartate) receptor, flow of calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ), decrease in CREB activation (DNA transcription factor), and secondary decrease in brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a mechanism that is more active in adolescent rats than in adults (Crews and Nixon, 2009; Zou and Crews, 2006; Oliveira-da-Silva *et al.*, 2009). Hence, it can be suggested that the nervous system of adolescent rats is more susceptible to apoptosis than in adult rats, which is why the present study found different results.

Tizabi *et al.* (2005), when studying apoptosis in a cell culture exposed to ethanol and nicotine, also observed that ethanol increases the number of cells in apoptosis in a dose-dependent manner. Thus, in the present experimental conditions, the ethanol dose may have been relatively low to significantly alter apoptosis in the hippocampal dentate gyrus of adult rats.

Nicotine, in turn, has a cytotoxic effect in progenitor cells of the hippocampus due to the suggested initiation of cell death through apoptosis by the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  (Berger *et al.*, 1998; Saitoh *et al.*, 2001). Some authors show that the effects of nicotine may be milder on the hippocampus compared with ethanol (Oliveira-da-Silva *et al.*, 2009; Tizabi *et al.*, 2005). However, under the

present experimental conditions, a greater number of apoptotic cells were found in the rats that inhaled cigarette smoke.

In accordance with the present results, Anbarasi *et al.* (2005), in a study using adult male Wistar rats exposed to cigarette smoke for 12 weeks, found an increase in the number of apoptotic cells in the cerebral cortex.

Since cigarette smoke is able to cause oxidative stress in several tissues and since the CNS is highly sensitive, it can be inferred that the cellular damage might have been caused by reactive oxygen species through oxidative damage on the DNA (Wang *et al.*, 2000; Carnevali *et al.*, 2003; Anbarasi *et al.*, 2005).

Studies have also suggested that apoptosis initiated by smoking originates in the oxidative stress associated with the Bax protein storage, with mitochondrial dysfunction and consequent release of cytochrome c, and activation of caspases with overexpression of bcl<sub>2</sub> (Wang *et al.*, 2000; Aoshiba *et al.*, 2001; Carnevali *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003).

Therefore, it is inferred that the high number of apoptotic cells in the animals exposed to cigarette smoke could be attributed to the oxidative stress caused by the countless cigarette smoke compounds on the CNS.

The interaction between nicotine and alcohol seems to potentialize the pleasurable effects of either drug (Virani *et al.*, 2009). The immunohistochemical technique for apoptosis showed an increase in apoptotic cells in group ALCTOB compared to both CTR and ALC. Some studies report that the interaction of the two drugs and their effects on the CNS are still unclear (Belluardo *et al.*, 2000; Tizabi *et al.*, 2003, 2004).

The increase in the number of apoptotic cells can be attributed to the oxidative stress caused by cigarette smoke, since no alterations were found in the group ALC (Anbarasi *et al.*, 2005).

The astrocytes may have been the target of chemical substances, which, in turn, alter it phenotypically. A specific marker for astrocytes is GFAP, a protein present in the intermediate filaments of the cytoskeleton of these cells. In extreme situations or even in some diseases, astrocytes become reactive: high GFAP production with alteration in the shape, hypertrophy of the cell body, and loss of astrocyte functions (O'Callaghan 1993; Santos *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2014).

The present results showed that ethanol caused a statistically significant decrease in GFAP compared to the controls. A similar result was reported by Teixeira *et al.* (2014) in a study carried out with adolescent male Wistar rats that received alcohol chronically. Those authors performed an immunohistochemical analysis for the antibody GFAP and observed cerebral cortex sections. The animals exposed to ethanol expressed fewer cells marked with GFAP, which suggests a relation between ethanol and the amount of GFAP.

Therefore, ethanol impacts the glia by decreasing the GFAP levels in adolescent, developing brains (Teixeira *et al.*, 2014). The present study observed the same for adult brains.

Regarding tobacco, the current results match those by Blutstein *et al.* (2013) in a study with pregnant sows. Those authors added dehydrated nicotine to the animals' drinking water in order to observe the response of the developing fetuses' neurons and astrocytes and, later, the adult offspring. The analysis showed that nicotine by itself decreases GFAP density in the

hippocampus of adult pigs exposed to nicotine in the gestational period. Those authors suggest that this can be explained by the abnormal maturation of the astrocytes. A similar result was found by Xu *et al.* (2003) in the hippocampus of adult rats exposed to nicotine in the gestational period.

Hence, the present results match those by Blutstein *et al.* (2013) and Xu *et al.* (2003), again showing that tobacco alters astroglia.

The group ALCTOB had a relatively lower optical density than the other groups. Silva *et al.* (2009) suggested that the drugs separately impact glia and neurons and that the combined use of both drugs, through mechanisms still unknown, also impact them. However, the harmful effects do not add up, thus leading to effects that can be considered relatively milder.

Studies have related a decrease in overall GFAP with fragility of the CNS, making the nervous tissue susceptible mainly to mechanical stress. Taking into account the other functions of the astroglia, CNS homeostasis maintenance is compromised (Nawashiro *et al.*, 1998; Pekny and Pekna 2004).

## **Conclusions**

Both alcohol and tobacco are harmful drugs to the CNS and lead to cell death through apoptosis, mainly due to the oxidative stress caused by cigarette smoke. The drugs, separately and in association, also impact glial cells by promoting glial alteration mainly in the astrocytes, where a lower GFAP optical density was observed. This makes CNS tissue more fragile and, thus, more susceptible to injuries.

Further studies are suggested on the association of drugs in order to elucidate the exact mechanism through which they impact the CNS and, particularly, glial cells.

**Acknowledgements:** This research was enabled with the aid of the funding agencies CNPq and CAPES. The authors are thankful for the Laboratory of Alcohol and Tobacco of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul and the staff at the Laboratory of Research in Pathology of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

## References

Aguayo LG, Pancetti FC, Klein RL, Harris RA. Differential effects of GABAergic ligands in mouse and rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1994;647:97-105.

Agulhon C, Sun MY, Murphy T, Myers T, Lauderdale K, Fiacco TA. Calcium Signaling and Gliotransmission in Normal vs. Reactive Astrocytes. *Front Pharmacol.* 2012;3:1-16.

Aliança de Controle ao tabagismo. Saúde. São Paulo: Aliança de Controle ao tabagismo; 2012 [capturado em 2014 Ago 10]. Disponível em: <http://actbr.org.br/tabagismo/saude.asp>

Anbarasi K, Vani G, Balakrishna K, Shyamala Devi CS. Effect of Bacoside A on membrane-bound ATPases in the brain of rats exposed to cigarette smoke. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005;19:59 – 65.

Aoshiha K, Tamaoki J, Nagai A. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281:L1392–L1401.

Belluardo N, Mudo G, Blum M, Fuxe K. Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav Brain Res.* 2000;113: 21–34.

Berger F, Gage FH, Vijayaraghavan S. Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci.* 1998;18: 6871–6881.

Blutstein T, et al. Differential Responses of Hippocampal Neurons and Astrocytes to Nicotine and Hypoxia in the Fetal Guinea Pig. 2013;24(1):80-93.

Borner C. Bcl-2 protein family: Sensors and check-points for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 2003;39:615–647.

Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, *et al.* Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284:L955–L963.

Casswell SE, Thamarangsi T. Reducing harm from alcohol: call to action. *Lancet.* 2009; 373: 2247–2257.

Crews FT., Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 2009; 44:115–127.

Crooks PA, Dwoskin LP. Contribution of CNS nicotine metabolites to the neuropharmacological effects of nicotine and tobacco smoking. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(7):743-53.

De A, Boyyadjieva NI, Pastoricic M, Reddy B, Sartar DK. Cyclic AMP and ethanol interact to control apoptosis and differentiation in hypothalamic B-endorphin neurons. *J Biol Chem.* 1994;269: 26697-26705.

Eppolito AK, Smith RF. Long-term behavioral and developmental consequences of pre- and perinatal nicotine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2006;85(4):835-841.

Fischer W, Franke H, Illes P. Effects of acute ethanol on the Ca<sup>2+</sup> response to AMPA in cultured rat cortical GABAergic nonpyramidal neurons. *Alcohol Alcohol.* 2003;38:394–399.

Fleming M, Mihic SJ, Harris RA. Drugs acting on the central nervous system *In:* Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman's Pharmacology*, 11th. San Diego. The McGraw-Hill, 2005.

Jang MH *et al.* Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuro Report.* 2002;13:1509–1513.

Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1997;20: 245-267.

Nawashiro H, Messing A, Azzam N, Brenner M: Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury. *Neuroreport.* 1998;9:1691-1696.

Nixon K, Crews FT. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry.* 2002;83(5):1087–1093.

O'Callaghan JP. Quantitative features of reactive gliosis following toxicant-induced damage of the CNS. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993;679:195–210.

Oliveira-da-Silva A, Vieira FB, Rodrigues FC, Filgueiras CC, Manhães AC and Villaça YA. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int. J. Dev. Neuroscience*. 2009;6:539-548.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. Academic Press Oxford UK: Elsevier:2005.

Pekny M, Pekna M: Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*. 2004;204:428-437.

Reynolds JN, Prasad A. Ethanol enhance GABAA receptor-activated chloride currents in chick cerebral cortical neurons. *Brain Res*. 1991;564:138–142.

Saitoh T, Tanaka S, Koike T. Rapid induction and Ca(2+) influx-mediated suppression of vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1) mRNA in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurochem*. 2001;78:1267–1276.

Santos LEC, Silveira GA, Costa VDC, Batista AG, Madureira AP, Rodrigues AM, et al. Alcohol Abuse Promotes Changes in Non-Synaptic Epileptiform Activity with Concomitant Expression Changes in Cotransporters and Glial Cells. *Plos one*. 2013 Nov;8(11):1-10.

Tatebayashi H, Motomura H, Narahashi T. Alcohol modulation of single GABA receptor-channel kinetics. *Neuro Report*. 1998;9:1769–1775.

Teixeira FB et al. Chronic Ethanol Exposure during Adolescence in Rats Induces Motor Impairments and Cerebral Cortex Damage Associated with Oxidative Stress. *Plos One*. 2014;9(6):1-8.

Tizabi Y, Al-Namaeh M, Manaye KF, Taylor RE. Protective effects of nicotine on ethanol-induced toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Neurotoxicol Res*. 2003;5:315–321.

Tizabi Y, Manaye KF, Smoot DT, Taylor RE. Nicotine inhibits ethanol-induced toxicity in cultured cerebral cortical cells. *Neurotoxicol Res*. 2004;6:311–316.

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

van Eeden SF, Hogg JC. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: the importance of bone-marrow stimulation. *J Toxicol Environ Health*. 2002;A65:1597–613.

Virani AD, Bezchlibnyk-Butler KZ, Jeffries JJ. *Clinical Handbook of psychotropic drugs*. 18<sup>th</sup> ed. New York. Hogrefe & Huber Publishers, 2009.

Walker DW, Barnes DE, Zornetzer SF, Hunter BE, Kubanis P. Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. *Science*. 1980 Aug; 209(4457):711–713.

Wang HY, Ma L, Li Y, Cho CH. Exposure to cigarette smoke increases apoptosis in the rat gastric mucosa through a reactive oxygen species-mediated and p53 independent pathway. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:1125–1131.

WHO calls on governments to do more to prevent alcohol-related deaths and diseases. Geneva: World Health Organization; 2014 [capturado em 2014 Ago 12]. Disponível em:<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/alcohol-related-deaths-prevention/en/>

Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Cunha CD, Deonizio JMD, Netto CA e Achaval M. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosinehydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental área. *Brain Res Protoc*. 2005;16(1-3):58-64.

Xu Z, Seidler FJ, Tate CA, Garcia SJ, Slikker Jr W, Slotkin TA. Sex-selective hippocampal alterations after adolescent nicotine administration: effects on neurospecific proteins. *Nicotine Tob Res*. 2003;5, 955–960.

Zernig G, Saria A, Kurz M, O'Malley SS. *Handbook of Alcoholism*. Boston. CRC Press: Boca Raton, FL., 2000. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/119971968/Zernig-G-Handbook-of-Alcoholism>.

Zhang FX, Rubin R, Rooney TA. Ethanol promotes apoptosis of rat cerebellar granule cells by interference with IGF-I signaling. *J Neurochem*. 1998;71:196-204.

Zou J, Crews F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol*. 2006;26:385–405.

## Appendices

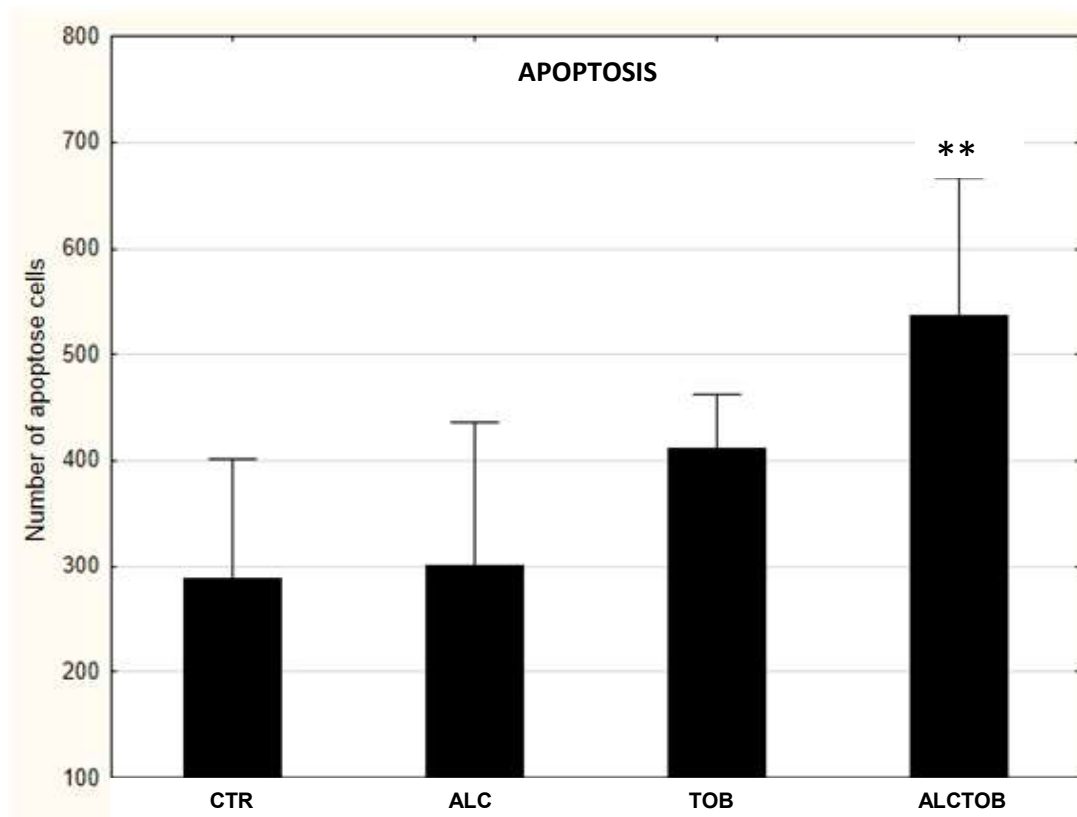


Figure 1. Number of apoptotic cells in the hippocampal dentate gyrus represented by the average number of total cells per group and standard deviation. \*\* Statistically significant compared to groups CTR and ALC.

<b>One-way analysis for apoptotic cells</b>			
<b>Groups/Data</b>	<b>Number of animals in the group</b>	<b>Average cells in apoptosis</b>	<b>Standard deviation</b>
<b>CTR</b>	8	287.75	114.46
<b>ALC</b>	8	301.29	135.66
<b>TOB</b>	9	411.22	51.33
<b>ALCTOB</b>	9	537.44	129.92 **

Table 1. Description of the data obtained in the apoptosis analyses,  $p < 0.001$ .

\*\* Statistically significant compared to groups CTR and ALC.

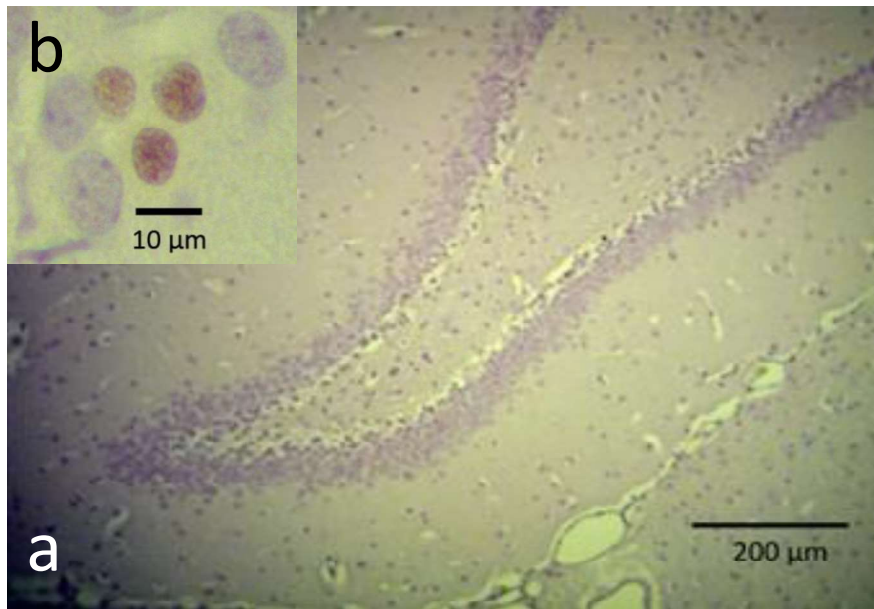


Figure 2. a) Section of the hippocampal dentate gyrus subjected to immunohistochemical technique for caspase-3. b) Inset of three immunoreactive cells for the antibody caspase-3.

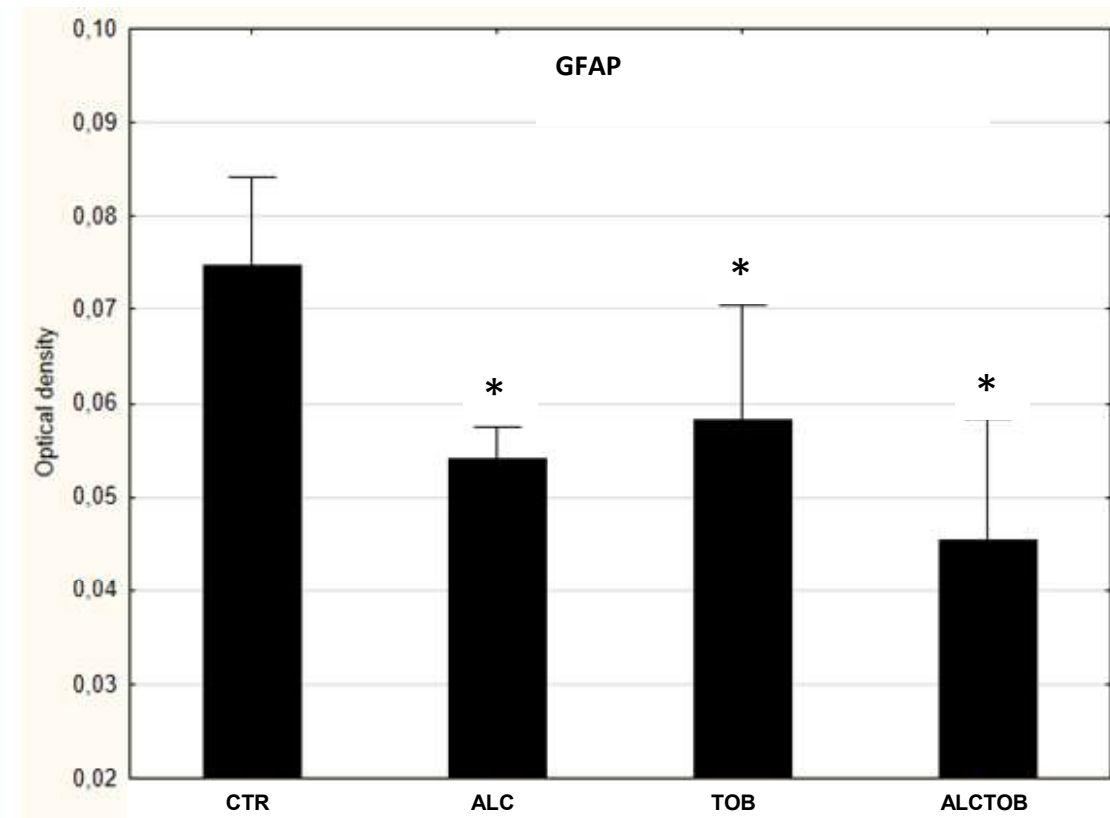


Figure 3. Optical densitometry obtained through immunohistochemistry for GFAP, expressed as mean and standard deviation. \*Statistically significant compared to group CTR.

<b>One-way analysis for GFAP</b>			
<b>Groups/Data</b>	<b>Number of animals in the group</b>	<b>GFAP OD</b>	<b>Standard deviation</b>
<b>CTR</b>	8	0.0747	0.00942
<b>ALC</b>	8	0.0542	0.00327 *
<b>TOB</b>	9	0.0583	0.01205 *
<b>ALCTOB</b>	9	0.0455	0.01285 *

Table 2. Description of the data obtained in the GFAP analyses through OD,  $p < 0.001$ . \* Statistically significant compared to group CTR.

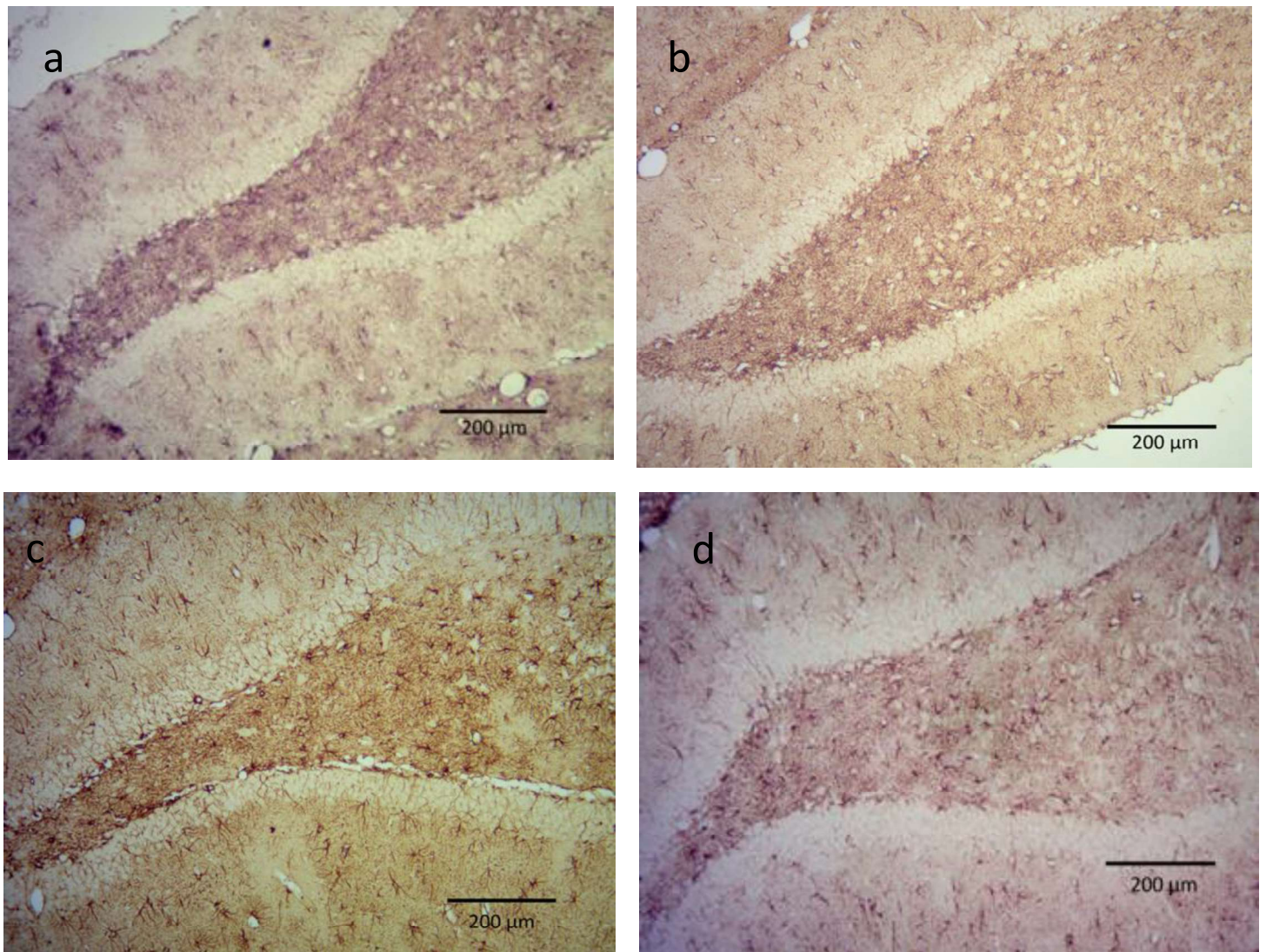


Figure 4. Images of sections of the hippocampal dentate gyrus immunoreactive for GFAP. a) section of group CTR, b) section of group ALC, c) section of group TOB, and d) section of group ALCTOB.

#### **4. Considerações finais**

O etanol e o tabaco estão associados a inúmeras comorbidades e são um problema de saúde pública mundialmente conhecido. Com nossos experimentos observamos que essas drogas tanto de maneira separada como em associação, são capazes de "fragilizar" o tecido nervoso.

O primeiro objetivo claro que visamos ao idealizarmos a pesquisa, foi observar a proliferação celular no giro dentado do hipocampo, com a utilização da 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU), um análogo sintético da timidina que é incorporada ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular. Devido a problemas técnicos, não conseguimos demonstrar por imuno-histoquímica o marcador desejado, para avaliação dessa variável.

Portanto, pretendemos num futuro próximo acrescentar aos resultados desta investigação, algum marcador de proliferação celular, para averiguar se existe alteração da atuação dessas drogas no giro denteado hipocampal.

## 5. Anexos

### 5.1 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  
UFCSA**

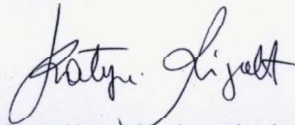
A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

**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.