

Andréia Oliveira da Silva

**Efeitos da nicotina e/ou etanol no hipocampo de camundongos  
adolescentes: morte celular e densidade neuronal e glial ao final da  
exposição e após a retirada das drogas**

Tese apresentada como requisito para  
obtenção do título de Doutor ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisiopatologia Clínica e Experimental da  
Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro.

Aprovada em 27 de novembro de 2009.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Yael de Abreu Villaça (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Jesus Landeira Fernandez  
Departamento de Psicologia – PUC/RIO

---

Prof. Dr. João Ricardo de Lacerda Menezes  
Instituto de Ciências Biomédicas/Dep. de Anatomia – UFRJ

---

Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2009

## DEDICATÓRIA

Aos dois grandes amores da minha vida: Julianna – o amor que dura a eternidade e Luis Antonio – o amor que é eterno enquanto dura.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a uma força interior que sempre me guia para frente e me conduz aos meus objetivos finais.

Agradeço aos meus pais Maria de Lourdes e Maurílio que com sua simplicidade e coragem me ensinaram que o melhor caminho é o da educação. Mãe! Pai! Vocês são verdadeiros Super Heróis!!!

Aos meus irmãos de sangue e de caminhada: Paulo Marconi – que me ensinou o valor da perseverança; Marília – que me ensinou o valor da humildade; Marilúcia – que me ensinou o valor do altruísmo; Anselmo – que me ensinou o valor da sabedoria; Adilson – que me ensinou o valor da fraternidade e Adriana – que espero ensinar alguma coisa de valor. Juntos compartilhamos momentos intensos e inesquecíveis.

Aos amigos e companheiros da Faculdade de Formação de Professores pelo apoio e incentivo na realização desse trabalho.

Ao professor Egberto Gaspar de Moura que me abriu as portas da Pós-graduação em Fisiopatologia.

À minha querida orientadora Yael de Abreu Villaça por ter me apoiado e orientado nas inúmeras dúvidas e incertezas para a elaboração dessa tese, com sua sabedoria foi me mostrando o melhor caminho a seguir durante a realização deste trabalho.

Aos professores Alex Christian e Cláudio Filgueiras pelas orientações nas horas mais necessitadas e por me salvar de tantos apuros no Laboratório de Neurofisiologia. Agradeço também pelas dicas sempre bem vindas nas horas de desespero e pelos momentos agradáveis na sala dos alunos.

Às amigas de laboratório: Mabelzinha, Fernanda Queridoca, Carlitcha e Moniqua, vocês são todas mulherzinhas!!!! Aos queridos amigos Anderson, Ulisses e André pelo apoio e carinho durante toda a realização desse trabalho.

Às várias Juli e Anas e à Dani pelos momentos alegres no cotidiano do laboratório e aos demais membros do grupo que tornaram a convivência mais agradável e a pesquisa mais interessante.

Um agradecimento muito especial à Fabiana Cristina Rodrigues que com sua ajuda e companheirismo tornou possível o término desse trabalho!!

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento pelas incontáveis horas passadas juntos na captura de imagens “perfeitas” no microscópio.

Aos amigos de longa data que acompanharam a jornada da minha vida: Ana Paula, Márcia, Luciene, Denise, Cláudio, Eduardo, Jack, Lucília, Rozana e Ronaldo (*in memoriam*). Obrigada pelo carinho e amizade. Com vocês aprendi muitas coisas e graças a vocês sou uma pessoa melhor do que era algum tempo atrás.

Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho de sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e também suas virtudes e vitórias e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua vida com a finalidade de colher boas flores e bons frutos ao longo do caminho.

*William Shakespeare*

## RESUMO

SILVA, Andréia Oliveira da. *Efeitos da nicotina e/ou etanol no hipocampo de camundongos adolescentes: morte celular e densidade neuronal e glial ao final da exposição e após a retirada das drogas*. Brasil. 2009. 155 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Fumar e consumir bebidas alcoólicas estão frequentemente associados durante a adolescência. Contudo, poucos estudos em modelos animais têm como foco as bases neurobiológicas da exposição combinada à nicotina e ao etanol no cérebro de adolescentes. Nesse estudo investigamos morte celular e alterações na densidade neuronal e glial nas regiões granulosa do giro denteado (GrDG), camada moleculare (Mol), CA1, CA2 e CA3 do hipocampo, durante a exposição e dois e cinco dias após o seu término. Para tanto, do 30º ao 45º dia pós-natal (PN30-PN45), 233 camundongos C57BL/6 machos e fêmeas foram expostos à nicotina (NIC) e/ou etanol (ETOH). Assim, quatro grupos experimentais foram utilizados: 1) NIC+ETOH: exposição concomitante a NIC (50µg/ml em 2% de sacarina na água de beber) e ETOH (25%, 2g/kg i.p. em dias alternados), 2) exposição à NIC, 3) exposição ao ETOH, 4) exposição ao veículo. Avaliamos morte celular por apoptose pela técnica do TUNEL, densidades neuronal e glial pelo método do Disector óptico e espessuras das regiões durante a exposição (PN45) e dois (PN47) e cinco dias (PN50) após o seu término. ANOVAs foram utilizadas para detectar efeitos do tratamento e/ou interações do tratamento com outros fatores. O grau de significância assumido foi de  $p < 0.05$ . Em PN45, a exposição ao etanol aumentou o número de células TUNEL+ em todas as regiões hipocâmpais quando comparado ao grupo veículo e a nicotina provocou uma resposta menos severa e dependente da região. Os animais que receberam nicotina+etanol não diferiram dos animais veículo em todas as regiões hipocâmpais. Em PN47, ainda foi identificado aumento no número de células TUNEL+ nos grupos ETOH e NIC, mas em menor magnitude que os efeitos identificados durante a exposição. Esses resultados foram acompanhados por redução das densidades neuronal e glial em todos os grupos tratados. Em PN50, a abstinência de nicotina e/ou etanol foi associada com reduções compensatórias de células TUNEL+ em todas as regiões hipocâmpais quando comparados com o grupo veículo e com a recuperação das densidades neuronal e glial. Não houve alterações nas espessuras das regiões nas três idades analisadas. Esses resultados sugerem que os efeitos deletérios da nicotina e/ou etanol durante a exposição e/ou da abstinência são revertidos durante a abstinência prolongada.

**Palavras chave:** Adolescente. Nicotina. Etanol. Apoptose. Morfologia. Hipocampo.

## ABSTRACT

Smoking and consumption of alcoholic beverages are frequently associated during adolescence. However, there have been few animal studies on the neurobiological bases of the combined exposure in the adolescent brain. In the present study, we investigated the effects of adolescent nicotine and/or ethanol exposure and withdrawal on the following regions of the hippocampus: Granular layer of the Dentate Gyrus (GrDG), Molecular layer (Mol), CA1, CA2 and CA3. From the 30<sup>th</sup> to the 45<sup>th</sup> postnatal day (PN30-PN45), 233 C57BL/6 male and female mice were exposed to nicotine free base (NIC) and/or ethanol (ETOH). Four groups were analyzed: 1) concomitant NIC (50 µg/ml in 2% saccharin to drink) and ETOH (25%, 2 g/kg i.p. injected every other day) exposure; 2) NIC exposure; 3) ETOH exposure; 4) vehicle. We evaluated cell degeneration (TUNEL assay), neuronal and glial densities (optical Disector) and region thicknesses during the exposure (PN45) and two (PN47) and five (PN50) days post-exposure. ANOVAs were used to identify treatment effects and/or interactions with other factors. Significance was assumed at the level of  $p < 0.05$ . On PN45, ETOH elicited an increase in the number of TUNEL+ cells relative to the vehicle group in all hippocampal regions. NIC elicited less severe region-dependent effects. Concomitant NIC and ETOH failed to elicit significant changes in the number of TUNEL+ cells. On PN47, the effects were similar to those described for PN45, even though smaller in magnitude. These results were paralleled by reductions in neuronal and glial cells densities for all treatment groups. In contrast, on PN50, ethanol and/or nicotine withdrawal were associated with compensatory reductions in TUNEL+ cells in all hippocampal regions. These results were paralleled by a reversal of effects on neuronal and glial densities. There were no effects on region thicknesses both during exposure and withdrawal. These results suggest that deleterious effects of nicotine and/or ethanol are reversed during prolonged withdrawal.

**Key words:** Adolescent. Nicotine. Ethanol. Apoptosis. Morphology Hippocampus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Médias dos valores de peso de fêmeas e machos .....	57
Figura 02	Médias de ingesta/peso de fêmeas e machos .....	58
Figura 03	Nº de células marcadas pelo TUNEL no final da exposição (PN45) .....	61
Figura 04	Fotomicrografias de células apoptóticas marcadas pelo TUNEL na camada CA3 ao final da exposição (PN45) .....	62
Figura 05	Densidade neuronal nas regiões hipocâmpais ao final do período de exposição (PN45) .....	63
Figura 06	Densidade glial nas regiões hipocâmpais ao final do período de exposição (PN45) .....	64
Figura 07	Fotomicrografias representativas de um par de Disector da região CA1 do hipocampo de camundongo do grupo veículo ao final do período de exposição (PN45) .....	65
Figura 08	Espessuras das regiões hipocâmpais estudadas ao final do período de exposição (PN45) .....	66
Figura 09	Nº de células marcadas pelo TUNEL dois dias após a retirada da nicotina e/ou etanol (PN47) .....	69
Figura 10	Fotomicrografias de células apoptóticas marcadas pelo TUNEL na camada CA1 dois dias após a exposição (PN47) .....	70
Figura 11	Nº de células marcadas pelo TUNEL cinco dias após a retirada da nicotina e/ou etanol (PN50) .....	71
Figura 12	Fotomicrografias de células apoptóticas marcadas pelo TUNEL na camada CA1 cinco dias após a exposição (PN50) .....	72
Figura 13	Densidade neuronal nas regiões hipocâmpais dois dias após a retirada do tratamento (PN47) .....	74
Figura 14	Densidade neuronal nas regiões hipocâmpais cinco dias após a retirada do tratamento (PN50) .....	75
Figura 15	Densidade glial nas regiões hipocâmpais dois dias após a retirada do tratamento (PN47) .....	76
Figura 16	Densidade glial nas regiões hipocâmpais cinco dias após a retirada do tratamento (PN50) .....	77



Figura 17	Espessuras das regiões hipocampais estudadas dois dias após a retirada do tratamento (PN47) .....	78
Figura 18	Espessuras das regiões hipocampais estudadas cinco dias após a retirada do tratamento (PN50) .....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Protocolo para coloração de TUNEL ajustado e utilizado pelo Lab de Neurofisiologia IBRAG/UERJ .....	49
<b>Tabela 2</b>	Razão entre células gliais/neurônios após o término da exposição .....	66
<b>Tabela 3</b>	Razão entre células gliais/neurônios com dois e cinco dias de abstinência .....	78

## LISTA DE ABREVIações

ANOVA	análise de variância
CA1	região dorsalmente localizada no <i>Cornu Ammonis</i> do hipocampo
CA2	região localizada entre as regiões CA1 e CA3 do hipocampo
CA3	região ventralmente localizada no <i>Cornu Ammonis</i> do hipocampo
F	valor do F de Fisher
GrDG	camada granulosa do giro denteado do hipocampo
FPLSD	Fisher's protected least significant difference
Mol	camada molecular do hipocampo
nAChRs	receptores nicotínicos acetilcolínicos
P	valor de prova
rANOVA	análise de variância com repetição
PN45	45º dia de vida pós-natal
PN47	47º dia de vida pós-natal
PN50	50º dia de vida pós-natal
TUNEL	técnica de imunomarcção pelo terminal 3'-OH do DNA pela desoxinucleotidil transferase

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
	Adolescência .....	17
	Tabaco vs. nicotina .....	20
	Aspectos gerais .....	20
	Aspectos farmacológicos .....	22
	Alterações morfológicas .....	25
	Etanol .....	27
	Aspectos gerais .....	27
	Aspectos farmacológicos .....	31
	Alterações morfológicas .....	33
	Interações entre nicotina e etanol .....	34
	Apoptose .....	38
	Estereologia .....	39
	Hipocampo .....	41
	Considerações finais .....	43
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
2.1	<b>Formação dos grupos experimentais</b> .....	46
2.2	<b>Ingesta de líquido, peso corporal e ingesta/peso</b> .....	48
2.3	<b>Análise morfológica</b> .....	48
2.4	<b>Detecção de células apoptóticas</b> .....	49
2.5	<b>Estereologia</b> .....	51
2.6	<b>Razão glia/neurônio</b> .....	52
2.7	<b>Espessura hipocampal</b> .....	52

2.8	<b>Análise estatística</b> .....	53
3	<b>RESULTADOS</b> .....	55
3.1	<b>Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência na ingesta de líquido/peso corporal e peso corporal dos animais tratados</b> .....	56
3.1.1	<u>Efeitos sobre o peso corporal</u> .....	56
3.1.2	<u>Efeitos sobre a ingesta de líquido/peso corporal</u> .....	56
3.2	<b>Efeitos da exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência no final do período de tratamento (PN45)</b> .....	60
3.2.1	<u>Morte celular por apoptose</u> .....	60
3.2.2	<u>Densidade neuronal</u> .....	64
3.2.3	<u>Densidade glial</u> .....	66
3.2.4	<u>Razão entre células gliais/neurônios</u> .....	66
3.2.5	<u>Espessuras das regiões</u> .....	66
3.3	<b>Exposição à nicotina e/ou ao etanol durante a adolescência: efeitos dois (PN47) e cinco dias (PN50) após o término do tratamento</b> .....	68
3.3.1	<u>Morte celular por apoptose – Análise global</u> .....	68
3.3.1.1	Morte celular em PN47 .....	68
3.3.1.2	Morte celular em PN50 .....	71
3.3.2	<u>Densidade neuronal – Análise global</u> .....	73
3.3.2.1	Densidade neuronal em PN47 .....	73
3.3.2.2	Densidade neuronal em PN50 .....	75
3.3.3	<u>Densidade glial – Análise global</u> .....	75
3.3.3.1	Densidade glial em PN47 .....	76
3.3.3.2	Densidade glial em PN50 .....	77
3.3.4	<u>Razão entre células gliais/neurônios</u> .....	77

3.3.5	<u>Espessura das regiões</u> .....	78
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
4.1	<b>Considerações metodológicas</b> .....	80
4.2	<b>Alterações no peso corporal e na ingesta de líquido/peso corporal</b> .....	84
4.3	<b>Efeitos da nicotina e/ou etanol no hipocampo</b> .....	84
4.3.1	<u>Danos hipocampais provocados pela nicotina</u> .....	84
4.3.2	<u>Danos hipocampais provocados pelo etanol</u> .....	87
4.3.3	<u>Danos hipocampais provocados pela nicotina+etanol</u> .....	89
4.3.4	<u>Razão entre células gliais/neurônios</u> .....	92
4.3.5	<u>Espessura das regiões</u> .....	92
4.4	<b>Considerações finais</b> .....	93
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	95
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96
	<b>ANEXO</b> .....	117

## **Artigo 1**

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 Oct;27(6):539-48

## **Artigo 2**

OLIVEIRA-DA-SILVA A; MANHÃES AC, CRISTINA-RODRIGUES F; FILGUEIRAS CC; ABREU-VILLAÇA Y. "Hippocampal Increased Cell death and Decreased Cell Density Elicited by Nicotine and/or Ethanol during Adolescence are Reversed with Prolonged Drug Withdrawal" *Neuroscience*. 2009 (submetido)