



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

ISABELA MARIA URRA ROSSETTO

**ETANOL E CAFEÍNA: INTERAÇÕES DAS EXPRESSÕES GÊNICAS DE
NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1, A2a E miRNAS NA INFLAMAÇÃO DO
CEREBELO DE RATOS UChB (CONSUMIDORES VOLUNTÁRIOS DE
ETANOL)**

ETHANOL AND CAFFEINE: INTERACTIONS OF NFkB, TLR4, TLR2,
MyD88, A1, A2a GENE EXPRESSIONS AND miRNAS ON CEREBELLAR
INFLAMMATION OF UChB RATS (VOLUNTARY ETHANOL CONSUMERS)

Campinas, 2019

ISABELA MARIA URRA ROSSETTO

“ETANOL E CAFEÍNA: INTERAÇÕES DAS EXPRESSÕES GÊNICAS DE NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1, A2a E miRNAS NA INFLAMAÇÃO DO CEREBELO DE RATOS UChB (CONSUMIDORES VOLUNTÁRIOS DE ETANOL)”

“ETHANOL AND CAFFEINE: INTERACTIONS OF NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1, A2a GENE EXPRESSIONS AND miRNAS ON CEREBELLAR INFLAMMATION OF UChB RATS (VOLUNTARY ETHANOL CONSUMERS)”

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Dissertation presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree in the area of Anatomy.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO(A) ISABELA MARIA URRA ROSSETTO E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO MARTINEZ.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Martinez

Co-orientador: Prof. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

CAMPINAS, 2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R735e Rossetto, Isabela Maria Urna, 1995-
Etanol e cafeína : interações das expressões gênicas de NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1, A2a e miRNAs na inflamação do cerebelo de ratos UChB (consumidores voluntários de etanol) / Isabela Maria Urna Rossetto. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Marcelo Martinez.
Coorientador: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cerebelo. 2. Etanol. 3. Cafeína. 4. Inflamação. 5. Rato UChB. I. Martinez, Marcelo. II. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Ethanol and caffeine : interactions of NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1, A2a and miRNAs on cerebellar inflammation of UChB rats (voluntary ethanol consumers)

Palavras-chave em inglês:

Cerebellum
Ethanol
Caffeine
Inflammation
UChB rats

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete [Coorientador]
Maria Júlia Marques
Luiz Fernando Takase

Data de defesa: 27-03-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4286-921X>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0894912384807148>

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^a. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete (Presidente)

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase (Membro titular externo)

Prof^ª. Dr^a. Maria Júlia Marques (Membro titular interno)

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“Não há lugar para sabedoria onde não há paciência.” (Santo Agostinho)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, a verdadeira fonte de Sabedoria, e à **Virgem Maria**, Sua Santíssima Mãe, por fortificar meus estudos, conduzir o seu curso e aperfeiçoar o seu fim.

Aos meus pais **Márcio e Luciana Rosseto**, por todo o suporte familiar, emocional e financeiro que me proporcionaram e pelo encorajamento dos sonhos de uma jovem estudante.

Às minhas irmãs, **Ana Clara e Maria Gabriela**, por terem suportado a ausência física de uma irmã e alegrado os meus finais de semana.

Aos meus avós **Maria Aparecida, Maria Manoelinha e João Urra**, que intercederam do céu por meus intentos e ao meu avô, **Osmir Rosseto**, que sempre me apoiou.

Ao meu namorado **João Paulo**, que sempre soube me auxiliar nos momentos de desesperança, me fazendo mais feliz a cada dia ao seu lado.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Martinez**, por todos os ensinamentos e toda a atenção dispensada a mim e a minha ânsia por aprender, desde os tempos da graduação, me inserindo ao mundo da ciência através da iniciação científica, até a concretização do Mestrado.

À **Profª. Drª. Valéria Quitete**, que me acolheu em seu laboratório e me proporcionou imenso amadurecimento profissional e pessoal, nunca medindo esforços para me auxiliar.

Aos colegas do **Laboratório de Biologia da Reprodução**, agradeço por todos o conhecimento técnico e pessoal que compartilhamos. À **Ellen**, pelo suporte e conselhos dentro e fora da universidade. À **Jéssica**, por nossa alegres imunos. À **Andressa**, por todas as dicas e experiências de vida. À **Celina**, por toda a ajuda e humor. À **Larissa**, por seu exemplo de profissional a seguir. Ao **Felipe**, por nossas tardes de dissecação e cultura de células. Ao **Fábio**, pela solicitude. À **Giovana**, pelas boas conversas.

Aos professores do **Laboratório de Anatomia** da Universidade Federal de São Carlos, **Maíra, Luiz e Salete**, que juntamente com o prof. Marcelo, inspiraram e cultivaram minha vocação à carreira acadêmica e à Anatomia.

Aos **professores** das disciplinas que cursei, por toda preocupação quanto ao ensino e ao exemplo como docentes.

Aos amigos **Bruno Henrique, Júnior, Amanda Stephanie, Gabriel Arruda, João Victor, Victor Mattiuzzo, Giovanna, Letícia, Milena, Catharina, Lívia, Paula, Chico, Cassuci, Alex, Edione, Matheus, Renan, Thalys, Guilherme e Ana Laura**, que tiveram grande contribuição nesses dois anos de mestrado, sempre me apoiando nas necessidades, de longe ou de perto.

Aos **técnicos** do Departamento de Biologia Celular e Estrutural, que forneceram ferramentas importantes para a concretização desse trabalho.

À **secretaria de Pós-Graduação** do Instituto de Biologia, pela organização e preocupação com os alunos. Em especial, à **Líliam Alves Senne Panagio** e ao **Prof. Dr. Edson Pimentel**.

Ao **CNPq** e à **FAPESP (2016/07410-8)**, pelo suporte financeiro e incentivo à pesquisa.

Ao Programa de **Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** e à **UNICAMP**, pela excelência no ensino e no desenvolvimento da ciência.

RESUMO

O consumo de etanol tende a aumentar os níveis de marcadores inflamatórios no Sistema Nervoso Central. A cafeína tem papel antagônico não-seletivo dos receptores adenosinérgicos. Sabe-se também que as vias adenosinérgicas desempenham ação protetora no SNC. Assim, supõe-se que o consumo de cafeína seja capaz de interferir nos processos celulares inerentes aos mecanismos inflamatórios, podendo atenuar a instalação da neuroinflamação. Os miRNAs afetam amplamente a função celular e fisiológica e podem mostrar-se alterados após o consumo de etanol e de outras substâncias, estando ligados à modulação da resposta inflamatória. O objetivo geral do trabalho foi o de detectar alterações das expressões de genes, microRNAs e proteínas relacionados aos processos inflamatórios e as vias adenosinérgicas do cerebelo a partir da interação entre etanol e cafeína. Ratos UChB e Wistar, machos com 5 meses de idade, foram divididos nos seguintes grupos (n=15/grupo): 1. UChB (ratos UChB que receberam solução de etanol a 10% e água *ad libitum*); 2. UChB+cafeína (ratos UChB que receberam solução de etanol a 10% + cafeína 3g/L e água *ad libitum*); 3. Controle (ratos Wistar que receberam água *ad libitum*). O cerebelo dos animais foi coletado e processado para as técnicas de RT-PCR, Western Blotting e imunohistoquímica para os marcadores inflamatórios NFkB, TLR4, TLR2 e MyD88 e receptores adenosinérgicos A1 e A2a e para os miRNAs -155-5p, -146a-5p, -126-3p, -132-3p, -339-5p, também mensurados no plasma. Para os miRNAs, houve aumento da expressão de todos os miRNAs teciduais analisados para o grupo UChB e redução da expressão dos mesmos a níveis comparáveis ao do grupo Controle para o grupo UChB+cafeína. No plasma sanguíneo, a cafeína elevou consideravelmente o nível dos *miR-126-3p* e *miR-132-3p* e diminuiu os níveis do *miR-155-5p*. O consumo de etanol elevou a expressão do *miR-146a-5p* e diminuiu os níveis do *miR-339-5p*. O grupo UChB apresentou níveis proteicos aumentados para NFkB e TLR4, principalmente para astrócitos de Bergmann e células de Purkinje. A cafeína reduziu a expressão dessas moléculas para níveis comparáveis ao do grupo Controle. O receptor A2a mostrou-se superexpresso para o grupo UChB, sendo a sua disposição celular mais evidente nas células da glia da Substância Branca. Para o receptor A1, houve maior expressão gênica no grupo UChB, mas seus níveis proteicos diminuíram para esse mesmo grupo. Concluiu-se que tanto o consumo de etanol quanto de cafeína foram capazes de modular miRNAs, marcadores inflamatórios e receptores adenosinérgicos em níveis proteicos e moleculares, sendo expressos diferencialmente nos tipos celulares do cerebelo. O etanol estabeleceu processo inflamatório e a cafeína atuou como neuroprotetora do tecido cerebelar.

ABSTRACT

Ethanol consumption tends to increase levels of inflammatory markers in the Central Nervous System. Caffeine has an antagonistic role in non-selective adenosine receptors. It is also known that the adenosinergic pathways play a protective role in the CNS. Thus, it is assumed that the consumption of caffeine interferes in the cellular processes inherent to the inflammation and may attenuate the installation of neuroinflammation. MiRNAs affect cellular and physiological function and are altered after consumption of ethanol and other substances, being linked to the modulation of the inflammatory response. The general objective of the study was to detect alterations in the expression of genes, microRNAs and proteins related to the inflammatory processes and the adenosinergic pathways of the cerebellum after the interaction between ethanol and caffeine. UChB and Wistar rats, males at 5 months of age, were divided into the following groups (n = 15 / group): 1. UChB (UChB rats receiving 10% ethanol solution and water ad libitum); 2. UChB + caffeine (UChB rats receiving 10% ethanol solution + 3g / L caffeine and water ad libitum); 3. Control (Wistar rats receiving water ad libitum). The cerebellar tissue of the animals was collected and processed for the RT-PCR, Western Blotting and immunohistochemistry techniques for the inflammatory markers NFκB, TLR4, TLR2 and MyD88 and adenosinergic receptors A1 and A2a and for the *miRNAs* -155-5p, -146a- 5p, -126-3p, -132-3p, -339-5p, also measured in plasma. For the miRNAs, an increase in the expression of all the tissue miRNAs was observed for the UChB group. The levels of these miRNAs were diminished to expressions comparable to the Control group for the UChB + caffeine group. In plasma, caffeine significantly elevated the level of *miR-126-3p* and *miR-132-3p* and decreased *miR-155-5p* levels. Ethanol increased *miR-146a-5p* expression and decreased *miR-339-5p* levels. The UChB group showed increased protein levels for NFκB and TLR4, mainly for Bergmann astrocytes and Purkinje cells. Caffeine reduced the expression of these molecules to levels comparable to the Control group. The A2a receptor was overexpressed for the UChB group, and its cellular disposition was evident in glial cells of the white matter. A1 receptor gene expression was elevated in the UChB group, but their protein levels were decreased for this same group. In conclusion, ethanol and caffeine consumption were able to modulate inflammatory markers, adenosinergic receptors and miRNAs at protein and molecular levels, being differentially expressed in the cell types of the cerebellum. Ethanol established an inflammatory process and caffeine acted as a neuroprotective substance at the cerebellar tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS

A1: Receptor de adenosina 1

A2a: Receptor de adenosine 2a

A2b: Receptor de adenosina 2b

A3: Receptor de adenosina 3

AA/ANA: Alko, Alcohol/ Alko, Non Alcohol

AChE: Acetilcolinesterase

AGO2: Proteína Argonauta 2

AMPc: 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico

ANOVA: Análise de variância

ATP: Adenosina Trifosfato

BSA: Albumina de Soro bovino

BV2: Linhagem celular de micróglia

cDNA: DNA complementar

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX-2: Ciclooxygenase-2

CT: Cycle threshold

DAB: Diaminobenzidina

DEPC: Dietil-pirocarbonato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA: Etilenodiamino tetra-acético

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

ERO's: Espécies reativas de oxigênio

FOXO3: Forkhead box protein O3

GABA: Ácido gama-aminobutírico

HAD/LAD: High Alcohol Drinking/ Low Alcohol Drinking

Has-: Homo sapiens

HMGB1: High mobility group box 1

HRP: Horseradish peroxidase

IFN- γ : Interferon- γ

IKK: IKB kinase

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintetase

IRAK1: Interleukin-1 receptor-associated kinase

IRT1: Iron-regulated Transporter 1

JNK: c-Jun N-terminal kinases

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

MHC-1: Complexo principal de histocompatibilidade 1

miR: microRNA ou miRNA

miR: miRNA

msP/-: Marchigian Sardinian Alcohol-preferring

MyD88: Fator de diferenciação mielóide 88

NFkB: Factor Nuclear kappa B

NMDA: N-metil D-Aspartato

P/ NP: Alcohol-preferring/ Alcohol-nonpreferring

PBS: Phosphate buffered saline

PDE: Fosfodiesterase

PTEN: Phosphatase and tensin homolog gene

RIPA: Tampão de radioimunoprecipitação

RNA: Ácido ribonucleico

Rno-: Rattus norvegicus

RT-buffer: Reverse transcriptase buffer

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SNC: Sistema Nervoso Central

SOCS-1: Suppressor of cytokine signaling 1

sP/sNP: Sardinian Alcohol-preferring/ Sardinian Alcohol-nonpreferring

TBS-T: Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20

TLR: Toll like receptor

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

TRAF6: TNF Receptor Associated Factor 6

UChA: Linhagem University of Chile Abstainer

UChB: Linhagem University of Chile Bibulous

WHP/WLP: Warsaw High-Preferring/ Warsaw Low-Preferring

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Alcoolismo	15
1.2. Efeitos do consumo de etanol sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)	16
1.3. Efeitos do consumo de cafeína sobre o SNC e processos inflamatórios	19
1.4. MicroRNAs como moduladores da neuroinflamação	21
1.5. Modelo experimental	23
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivos Gerais	26
3.2. Objetivos Específicos	26
4. ARTIGO CIENTÍFICO I	27
RESUMO	28
4.1. INTRODUÇÃO	30
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.2.1. Procedimentos experimentais	33
4.2.2. Expressões dos <i>microRNAs</i> -155, -132, -126, -146a e -339-5 no tecido cerebelar	33
4.2.3. Expressão sérica dos <i>microRNAs</i> -155, -132, -126, -146a e -339-5p	35
4.2.4. Análises estatísticas	35
4.3. RESULTADOS	36
4.3.1. Cafeína reverteu o aumento da expressão de miRNAs após o consumo de etanol no cerebelo	36
4.3.2. Cafeína elevou o nível de miRNAs circulantes	38
4.3.3. O consumo de etanol influenciou a expressão de miRNAs circulantes	38
4.4. DISCUSSÃO	39
4.5. CONCLUSÃO	44
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
5. ARTIGO CIENTÍFICO II	51
RESUMO	52
5.1. INTRODUÇÃO	54

5.2. MATERIAL E MÉTODOS	58
5.2.1. Procedimentos experimentais.....	58
5.2.2. Expressões gênicas de NFkB, MyD88, TLR4, TLR2, A1, A2a no tecido cerebelar...	59
5.2.3. Extração de Proteínas e Western Blotting.....	60
5.2.4. Imunomarcção dos antígenos NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1 e A2a.....	61
5.2.5. Método de quantificação da imunohistoquímica	61
5.2.6. Análises estatísticas.....	62
5.3. RESULTADOS	64
5.3.1. Expressão gênica dos marcadores inflamatórios e receptores adenosinérgicos no tecido cerebelar	64
5.3.2. Níveis proteicos dos receptores adenosinérgicos e marcadores inflamatórios no tecido cerebelar	65
5.3.3. Etanol e cafeína alteraram diferencialmente a expressão dos marcadores inflamatórios para os tipos celulares analisados.....	68
5.3.4. Etanol e cafeína alteraram diferencialmente a expressão dos receptores adenosinérgicos para os tipos celulares analisados	76
5.4. DISCUSSÃO.....	81
5.5. CONCLUSÃO	87
5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXO I – Certificado de Aprovação CEUA UNICAMP.....	102
ANEXO II – Certificado de Aprovação CEUA UFSCar	103
ANEXO III – Declaração de direitos autorais	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alcoolismo

A ingestão de bebidas alcoólicas pelos seres humanos faz parte dos hábitos de diversas sociedades, correlacionando prazer, razões comportamentais e rituais (POLI et al., 2013). As primeiras evidências do preparo de bebidas adicionadas de álcool datam da pré-história, antes dos seres humanos estabelecerem comunidades fixas (KHADERI, 2019). Desde então, o consumo de etanol acompanhou as civilizações, tomando diferentes conotações culturais até atingir o seu ápice no século XIX, após a revolução industrial (GATELY, 2008). Esse hábito aumentou drasticamente nos últimos anos a partir de fenômenos de socialização e através da divulgação publicitária (GONZALEZ-MENENDEZ, 2016).

Clinicamente, o alcoolismo surge como uma entidade amorfa, de diagnóstico, prognóstico e tratamento ainda pouco esclarecidos (BERESFORD; WONGNGAMNIT; TEMPLE, 2014), definido pelo conceito clássico de uma síndrome multifatorial, composta por comprometimentos físicos, comportamentais e socioeconômicos (EDWARDS; GROSS, 1976). Consumir etanol de forma indiscriminada é um dos principais fatores de riscos à saúde, sendo tal substância responsável por 5,9% do total de mortes no mundo a cada ano, sendo 7,6% para homens e 4,0% para mulheres. As principais causas de mortes associadas ao consumo de etanol incluem doenças cardiovasculares e diabetes (33.4%), doenças gastrintestinais (16.2%) e cânceres (12.5%). A isso, somam-se ainda as desordens neuropsiquiátricas, uma vez que o etanol é uma substância psicoativa capaz de gerar dependência (OMS, 2018).

Determinar o limite entre o beber social, o uso abusivo ou nocivo de etanol e o alcoolismo (Síndrome de Dependência do Etanol) é difícil, pois são tênues, variando entre os indivíduos de uma mesma população e dentre as diferentes culturas. Socialmente, o consumo de etanol está ligado a consideráveis vicissitudes, como formas de violência, problemas familiares, negligência infantil e absenteísmo (LIMOSIN, 2014; OUDLAUG et al., 2016; OMS, 2018).

Em consequência de ser uma doença multifatorial, são incontáveis os coeficientes que computam a predisposição do indivíduo ao vício pelo consumo de etanol, com risco para o desenvolvimento da dependência determinado pela interação entre a composição genética do indivíduo, fatores ambientais e neuroadaptações que ocorrem após a exposição aguda e repetida da droga. Aproximadamente 50% do risco do desenvolvimento de desordens relacionadas ao álcool é herdável e a outra metade dos riscos são atribuíveis a fatores ambientais (VERHULST; NEALE;

KENDLER; 2015).O etanol pode induzir alterações na expressão de genes e ainda modificar as funções sinápticas que contribuem para o desenvolvimento de comportamentos tais como a tolerância, a sensibilização e a caracterização do vício pelo consumo compulsivo (GILPIN et al., 2008; FARRIS et al., 2015).

1.2. Efeitos do consumo de etanol sobre o Sistema Nervoso Central (SNC)

O etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), também conhecido como álcool etílico, é o mais comum dos alcoóis e é uma substância orgânica obtida através da fermentação alcoólica de açúcares, hidratação de etileno ou redução de acetaldeído. Também é o mais importante ingrediente com ação psicofarmacológica presente, principalmente, em bebidas alcoólicas e o responsável pelas diversas desordens advindas do alcoolismo (PEANA et al., 2016).

Os efeitos de recompensa, prazer e estimulação gerados pelo consumo de etanol são mediados pela liberação de dopamina no sistema mesolímbico dopaminérgico, o qual projeta para as áreas corticais orbitofrontal e pré-frontal, responsáveis por regular o controle motivacional e cognitivo do indivíduo (NORONHA et al., 2014). O etanol afeta também os sistemas de neurotransmissores envolvendo o ácido γ -aminobutírico, opióides endógenos, glutamato, canabinóides, noraepinefrina, serotonina (KRANZLER; SOYKA; 2018), bem como sistemas neuroendócrinos, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HILLEMACHER; LEGGIO; HEBERLEIN; 2015). Há diferentes estudos na literatura no que se refere aos efeitos centrais dessa substância como estando primariamente relacionada à ação dos receptores GABA_A, receptores de glutamato NMDA e envolvendo também o sistemas adenosinérgico. Por meio dessas interações moleculares, o etanol é capaz de alterar o equilíbrio do microambiente interno do SNC e levar a processos como a neurodegeneração, afetando o encéfalo como um todo (PEANA et al., 2016).

O etanol pode ser considerado uma neurotoxina capaz de alterar as propriedades físico-químicas das membranas plasmáticas, afetando a embriogênese, migração e diferenciação neuronal (PEANA et al., 2016). Os efeitos da exposição crônica e aguda ao etanol no SNC encontram-se bem documentados, principalmente quando relacionados ao encéfalo imaturo, no que se refere aos transtornos do espectro alcoólico fetal. Dentre as condições mais comuns desse transtorno, destaca-se o aspecto neurológico comumente composto por microencefalia, anormalidades da medula espinhal, mal-formações do corpo caloso, cerebelo, núcleo caudado e hipocampo (DENNY;COLES; BLITZ; 2017).

Os efeitos pós-natais do consumo de etanol, no entanto, são menos estudados, mas algumas das consequências advindas do uso de tal substância são evidentes em todo encéfalo, como o patológico alargamento dos sulcos e afilamento dos giros pela perda de elementos celulares da camada cortical e da substância branca através de processos de morte celular, tendo em destaque a apoptose (WANG; WANG, 2015). Sendo as funções dos neurônios cerebelares rigidamente controladas por *inputs* inibitórios GABAérgicos providos pelos interneurônios localizados nas camadas granular e molecular (LUO, 2015), a ação central do etanol a partir dos receptores GABA_A elucida e justifica o envolvimento do cerebelo nas diversas alterações resultantes da exposição a essa droga, sendo afetadas as diversas camadas celulares que compõem a circuitaria cerebelar (PEANA et al., 2016) e que são basicamente três, quando observa-se o córtex cerebelar: a camada molecular, mais superficial, seguida pela camada de células de Purkinje e pela camada granular, mais profunda (VOZEH, 2016).

Nesse contexto, o cerebelo como órgão-alvo do etanol se torna evidente quando levados em consideração os aspectos clínicos de pacientes expostos à droga. Em crianças que sofreram exposição pré-natal ao etanol, por exemplo, muitas mostraram sintomas especificamente associados a déficits cerebelares, sendo encontrada redução do volume cerebelar, em especial do tamanho do vérmis (AUTTI-RÄMÖ et al., 2002). Em alcoólicos crônicos, distúrbios da marcha e ataxia dos membros são sintomas clínicos de disfunção cerebelar evidente (JAATINEN; RINTALA, 2008; LUO, 2015).

O cerebelo humano ocupa apenas cerca de um décimo do volume encefálico, mas abriga grande parte do número total de neurônios e, devido a esse grande potencial funcional, além do seu clássico papel como mantenedor da postura e centro do controle e da função motora, o conceito moderno das funções cerebelares traz esse órgão como participante de processos homeostáticos, endócrinos, visceromotores, e ainda relacionados à cognição, memória, aprendizado, recompensa e emoções (VOZEH, 2016; WAGNER et al., 2017).

Quanto ao efeito direto do etanol nas camadas que compõem o córtex cerebelar, tem sido relatada a susceptibilidade dos neurônios de Purkinje, Golgi e Granulares a variações agudas e crônicas nos níveis sanguíneos de etanol, em diferentes idades (GHIMIRE et al., 2009; BAGHERI et al., 2015). Modificações na estrutura celular foram observadas após consumo crônico de etanol em ratos, resultando em dilatação do retículo endoplasmático liso nos neurônios de Purkinje, processo acompanhado por morte neuronal ou apoptose axonal (DLUGOS, 2015).

Também o cerebelo de ratos adultos UChA apresentou neurônios granulares e de Purkinje com núcleos apoptóticos, citoplasma com acúmulo de gotas lipídicas e desorganização da substância branca (OLIVEIRA et al., 2014). Martinez et al.(2015) relataram o corpo medular do cerebelo de ratos UChA adultos com número significativo de células apoptóticas, aumento nos espaços interaxonais e deterioração da bainha de mielina com desestruturação de sua forma característica.

Além das modificações estruturais, a ingestão de etanol aumenta os níveis cerebrais de moléculas reconhecidamente envolvidas com a resposta imune, evidenciando a instalação de um processo de neuroinflamação. Há evidências que indicam que o consumo crônico de etanol aumenta o nível de citocinas no SNC (CREWS et al., 2006). Em ratos submetidos ao consumo crônico de etanol houve aumento da expressão de iNOS, COX-2 e IL-1b, além do aumento de três das maiores famílias de quinases estressoras existentes (ERK 1/2, p38 and JNK) (VALLES et al., 2004). Eventos similares ocorreram com macrófagos tratados in vitro com níveis moderados (10-50 mM) de álcool (FERNANDEZ-LIZARBE et al., 2008).

A micróglia, célula responsável pela resposta imune inata dentro do SNC, e os neurônios, respondem sinalizando através da estimulação de receptores do tipo Toll (TLR's), que ativam, direta ou indiretamente, a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NFkB), microRNAs e citocinas pró-inflamatórias (CREWS et al., 2017; VETRENO et al., 2018). A ativação do NFkB estimula a transcrição do fator de necrose tumoral, TNF- α , cuja ação pode levar a apoptose ou necroptose (BORGHI; VERSTREPEN; BEYAERT, 2016).

A inflamação dentro do SNC, em consequência do alcoolismo, parece estar ligada à ativação do TLR4 (PASCUAL et al., 2017) sendo que a extinção da expressão do TLR4 elimina diversos dos efeitos neuroimunes advindos do consumo de etanol (MONTESINOS et al., 2015). Um dos maiores produtos do mecanismo de sinalização a partir da ativação do TLR4 é o NFkB, regulador-chave nas respostas imunes e inflamatórias. A ativação do NFkB através da ativação de receptores do tipo Toll (TLRs) é conservada evolutivamente e se encontra em diversas espécies filogeneticamente distintas. Esse marcador pode ser expresso em resposta a diferentes estímulos, dentre eles o estresse químico produzido pelo etanol, a fim de regular a expressão de genes que estão envolvidos com os processos imunes, inflamatórios e apoptóticos. Sua presença na célula modula a expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (ZHANG; GHOSH, 2001).

Além dos receptores tipo Toll, é importante a presença na célula do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), molécula adaptadora essencial para sinalização através dos TLRs, resultando na transdução de sinais e na produção de citocinas pró-inflamatórias. O consumo crônico de etanol tende a aumentar os níveis de MyD88, sustentando a ativação do TLR4 e levando a uma maior produção de NFkB, e à instalação de um processo inflamatório (ALFONSO-LOECHES et al., 2010). Também, o TLR2 é um receptor que aparentemente pode ser recrutado pelo etanol, levando à ativação da resposta imune inata e à neuroinflamação. Fernandez-Lizarbe, Montesinos e Guerri (2013) propuseram que o etanol é capaz de levar à associação dos receptores TLR2 e TLR4 e, dessa forma provocar a reatividade das células microgлияis.

1.3. Efeitos do consumo de cafeína sobre o SNC e processos inflamatórios

A cafeína, uma xantina alcaloide, é a substância psicoativa mais consumida no mundo (FREDHOLM; YANG; WANG, 2016). É encontrada em uma ampla variedade de alimentos e bebidas, como refrigerantes, chocolates, cafés e chás. Suas ações sobre o comportamento humano têm sido objeto de estudos há décadas e ainda hoje persistem debates científicos muito amplos sobre seus efeitos benéficos e deletérios sobre diversos sistemas e funções do organismo (DE MEJIA; RAMIREZ-MARES, 2014). A cafeína é consumida, principalmente, por suas propriedades estimulantes (DOEPKER et al., 2016) e apresenta ação farmacológica variada provocando alterações reconhecidas no SNC, no sistema cardiovascular e na homeostase do cálcio (DE MARIA; MOREIRA, 2007). O efeito estimulante da cafeína deve-se ao seu papel antagônico não-seletivo dos receptores adenosinérgicos A1, A2a, A2b e A3, tendo maior destaque a participação dos dois primeiros. Assim, tais receptores participam da composição do sistema adenosinérgico, presente também no encéfalo humano, onde é reconhecido como um modulador da neurotransmissão e da resposta inflamatória, além de respostas de outras naturezas (WARDAS, 2002).

A adenosina é uma molécula endógena chave que regula a função tecidual através da proteína G acoplada aos receptores adenosinérgicos. Muitas células imunes expressam esses receptores e são responsivas aos efeitos modulatórios da adenosina (HASKÓ et al., 2008). O receptor de adenosina A2a é um dos reguladores fisiológicos mais importantes da resposta inflamatória. Encontra-se expresso em diversos tecidos, sendo abundantemente encontrado em células imunes. A ativação desse receptor pela adenosina, que é liberada pela célula quando esta

se encontra em um ambiente potencialmente lesivo ou hipóxico, tem amplos efeitos anti-inflamatórios: inibe a secreção de mediadores inflamatórios pelas células imunes, consequentemente diminuindo a resposta inflamatória (HEYN et al., 2012).

A quebra da adenosina trifosfato (ATP) pelas atividades do organismo durante o dia aumenta a quantidade de adenosina livre no SNC, que, por sua vez, se liga aos receptores A1 e A2a. Essa ligação diminui a atividade neural e promove o estado de sonolência e sensação de cansaço. A conformação da cafeína permite a sua ligação a esses receptores sem diminuir, no entanto, a atividade neural, pois a sua estrutura apesar de semelhante à da adenosina, não ativa as mesmas cascatas de sinalização para a diminuição do desempenho cerebral. Dessa maneira, a cafeína age como estimulante do SNC através da inibição por competição dos efeitos da adenosina (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004; PELELI et al., 2017).

A cafeína é capaz de interferir em diversas vias, mais diretamente sobre a adenosinérgica, porém seus efeitos também se mostram nas vias glutamatérgica e a dopaminérgica (FERRÉ, 2008, 2010). Sabe-se que a via adenosinérgica desempenha papel protetor importante no SNC (WARDAS, 2002), então, supõe-se que o consumo de cafeína seja capaz de interferir justamente nos processos celulares inerentes aos mecanismos inflamatórios, podendo prevenir, retardar ou até mesmo atenuar a instalação da neuroinflamação e, indiretamente, da neurodegeneração (HEIMFARTH et al., 2013). Por atuar através desse sistema, que tem função importante no contexto de proteção do tecido, a cafeína tem potenciais efeitos sobre a modulação dos processos inflamatórios, principalmente pela ativação dos receptores A2a, presente em células imunes. Apesar da relação entre as vias da inflamação e as vias adenosinérgicas ainda não serem completamente estabelecidas, Tsuitsui e colaboradores (2004) notaram que o aumento de receptores adenosinérgicos A1 atenuou a desmielinização e neuroinflamação em modelos de esclerose múltipla. Madeira et al. (2016) mostraram que houve diminuição na inflamação da retina de modelos animais para glaucoma nos grupos que ingeriram cafeína. Estudos sugerem que a ativação dos receptores A2a resulta em fenótipos reativos de micróglia, levando a aumento de fatores neurotóxicos e de elementos não celulares que culminam no estabelecimento da neuroinflamação (BOIA; AMBROSIO; SANTIAGO, 2016). Reforçando a hipótese da cafeína como neuroprotetora, estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de cafeína está inversamente relacionado ao surgimento de disfunções neurológicas como Alzheimer e Parkinson,

cujo eixo de patogênese é a neuroinflamação crônica (BROTHERS; MARCHALANT; WENK, 2010).

O consumo de etanol também tem notáveis efeitos sobre o sistema adenosinérgico e as suas inter-relações começam a ser exploradas à luz da literatura atual. A exposição aguda ao etanol aumenta os níveis extracelulares de adenosina, pressupondo a sua mediação nos efeitos atáxicos, sedativos e hipnóticos do etanol, enquanto a exposição crônica ao álcool leva a uma diminuição da expressão e sinalização adenosinérgica (ELMENHORST et al.; 2018). Além do mais, a modulação desregulada da transmissão glutamatérgica pela adenosina na região estriatal tem implicado fortemente num potencial abuso de etanol pelo indivíduo (RUBY et al., 2014). São escassos ainda os trabalhos que relacionam os efeitos do etanol sobre as vias adenosinérgicas. Mas, sabe-se, no entanto, que essa substância é capaz de modular a expressão de receptores de adenosina. Butler & Prendergast (2012) apontaram que alterações na sinalização adenosinérgica estão na interface de diversos efeitos trazidos pela exposição aguda ao etanol, particularmente no que se refere à sedação e função motora. Ainda nesse estudo, a exposição crônica ao etanol mostrou adaptações na superfície celular quanto à expressão e função tanto de receptores A1 quanto de A2a. Kuo et al. (1979) descreveram diminuição do modulador inibidor da adenosina no cerebelo de camundongos após ingestão de etanol, cafeína e fenobarbital. Parkinson et al. (2009) analisaram as expressões gênicas dos receptores de adenosina e enzimas metabolizadoras de purina em camundongos transgênicos consumidores de etanol e cafeína.

Segundo Martinez e colaboradores (2018), analisando a ação do consumo concomitante de etanol e cafeína no cerebelo de ratos UChB, relevante capacidade da cafeína em reverter os danos apoptóticos causados pelo etanol nas células Granulares, de Golgi e ainda nas células da Glia do cerebelo foram identificados, suprimindo em grande parte a expressão de Caspase-3 e intensificando a expressão de XIAP. No entanto, pouco ainda se sabe sobre como a cafeína é capaz de agir para a atenuação da perda neuronal. Acredita-se que dentre as formas de retardo dos processos neurodegenerativos, uma das formas, além da diminuição da taxa de apoptose, seja, primeiramente, pelo combate à neuroinflamação (ULLAH et al., 2015; MADEIRA et al., 2016).

1.4. MicroRNAs como moduladores da neuroinflamação

Em um estudo de revisão, Su e colaboradores (2016) trazem que a expressão alterada de microRNAs foi identificada em diversas condições patológicas, incluindo a neuroinflamação,

neurodegeneração e doenças auto-imunes. Evidências sugerem os microRNAs como moléculas centrais no controle da neuroinflamação, sendo conhecidos principalmente por sua capacidade de modificar o estados das células microgliais, induzindo-as à atividade ou a quiescência (CREWS et al, 2017).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs não-codificantes que afetam amplamente a função celular e fisiológica em organismos multicelulares (BARTEL, 2004). São compostos por aproximadamente 21 a 23 nucleotídeos, regulando a tradução de RNAs específicos através da ligação complementar a sequências reguladoras do RNA, levando à degradação ou à desestabilização do mRNA. Cerca de 5000 os microRNAs são existentes em seres humanos, sendo que cada um deles é capaz de se ligar a uma média de 200 mRNAs (BARTEL, 2004; GAUDET et al., 2017). Assim, é possível que os pequenos RNAs sirvam como "mestres" reguladores da função celular (MIRANDA et al., 2010).

Os microRNAs, e outros RNAs não-codificantes, foram recentemente descobertos. Sendo assim, o seu papel funcional dentro do contexto da neuroinflamação ainda se mantém obscuro, mas essas pequenas moléculas parecem ser importantes para o início da inflamação e para a sua manutenção (LIU; ABRAHAM, 2013) e algumas delas tem grande influência no cenário pró- ou anti-inflamatório dentro do SNC.

Prasada (2017) traz que níveis elevados de receptores A2a, aparentemente uma proteína-alvo do *microRNA-34b*, foram encontrados na autópsia do tecido cerebral de pacientes com Parkinson. Também Zhao e colaboradores (2015) identificaram que há uma relação mútua entre o *microRNA-214* e o receptor A2a fora do SNC, ambos desempenhando importante papel na resposta inflamatória e mostrando que os níveis baixos de expressão desse microRNA aumenta os efeitos inflamatórios de receptores A2a em macrófagos. Tal receptor ainda se mostra passível de modulação pelos *microRNAs -15 e -16* (HEYN et al., 2012). Ainda em tecidos periféricos, Wu e colaboradores (2016) mostram que o *microRNA-206* está envolvido na patogênese da colite ulcerativa pela regulação de receptores de adenosina A3. Assim, uma maior compreensão da regulação dos microRNAs sobre a inflamação poderia aumentar o potencial terapêutico dessas pequenas moléculas não-codificadoras (OLIVIERI et al., 2013).

1.5. Modelo experimental

As variedades de ratos UChA (Abstainer rat) e UChB (Bibulous rat) são modelos de alcoolismo experimental, selecionados a partir do *Rattus norvegicus albinus* (também conhecidos como Wistar) durante a década de 50, na Universidade do Chile, de onde se originou o nome UCh (MARDONES; SEGOVIA-RIQUELME, 1983; QUINTANILLA et al., 2006). Os ratos UChA possuem perfil de baixo consumo voluntário (0,1-2 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo ao dia) e os ratos UChB, alto consumo voluntário (5-7 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo ao dia), bem estabelecidos pelo trabalho pioneiro de Mardones na Universidade do Chile (MARDONES; SEGOVIA; HEDERRA, 1953).

A criação seletiva bidirecional é uma poderosa ferramenta genética que tem sido empregada há muito tempo para estudar a genética de muitos fenótipos associados ao etanol (CRABBE; PHILLIPS; BELKNAP, 2010). Existem principalmente sete linhagens de animais com elevado consumo de etanol, utilizadas globalmente, que foram selecionadas a partir da criação seletiva bidirecional, resultando em um modelo que apresenta preferência pelo etanol e outro em que essa preferência não é aparente: AA/ANA (Helsinki, Finlândia), HAD/LDA (Indiana, EUA), P/NP (Indiana, EUA), sP/sNP (Cagliari, Itália), UChA/UChB (Santiago, Chile), msP/- (Cagliari, Itália), WHP/WLP (Varsóvia, Polônia). O programa de criação seletiva para todas essas linhagens foi o de 24 h, que tem dois critérios principais de seleção. Em primeiro lugar, a linhagem precisa consumir pelo menos 5 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo por dia. Essa quantidade, 5 g/kg/dia, clinicamente, corresponderia para o roedor, a um homem de aproximadamente 75kg ingerindo diariamente cerca de 200 ml de uísque contendo 45% de volume de etanol em sua composição (o que seria, aproximadamente 1g de etanol/kg/dia). O segundo critério exige que os animais prefiram a solução de etanol a 10% no lugar de água numa taxa de 2:1 (BELL et al., 2017). Segundo Bell e colaboradores (2017), todas as sete linhagens citadas anteriormente cumprem os critérios de seleção estabelecidos e atingem, seguramente, os níveis de concentração de álcool no sangue necessários à intoxicação alcoólica após a livre oferta de solução de etanol a 10% e água, ou seja, 50-200 mg/ml de sangue. Nesse mesmo trabalho, reúnem-se evidências suficientes para afirmar que o consumo crônico de etanol na linhagem UChB leva a dependência nesses animais, sendo que a suspensão do uso traz sintomas de abstinência.

Classicamente, são critérios para um modelo animal ideal de alcoolismo humano quatro importantes itens: (1) a capacidade de se atingir níveis farmacologicamente relevantes de

concentração de álcool no sangue; (2) a capacidade de manter constante concentração de álcool no sangue; (3) o desenvolvimento de dependência física ao etanol; (4) manutenção da dependência física pelo etanol através do consumo voluntário (FADDA, 1998). A linhagem de ratos UChB enquadra-se nesses critérios. Na revisão empreendida por Bell e colaboradores (2017) aparece como um modelo de alcoolismo experimental válido, equiparado aos outros seis modelos de criação seletiva bidirecional existentes no mundo. Sua única limitação está em aspectos que permanecem desconhecidos pela falta de estudos, como por exemplo, se o consumo crônico de etanol leva a tolerância metabólica, apesar de já ser consenso que, nessa linhagem, o consumo crônico de etanol leva a uma tolerância funcional. A mesma questão é levantada para outros cinco dos seis modelos restantes.

É fato que não há um modelo experimental perfeito para o alcoolismo humano. Por outro lado, quando comparada à outras linhagens de animais bebedores, os animais UCh encontram grande respaldo na literatura e estão entre os modelos de alcoolismo experimental mais utilizadas em pesquisas. A partir desse modelo, hipóteses podem ser formulados acerca do alcoolismo humano, que está envolvido com fatores muito mais complexos, que adentram a esfera emocional e social, e que dificilmente poderão ser reproduzidos em um modelo animal. Assim, um modelo que se assemelhe aos contextos de consumo de etanol nos seres humanos é algo bastante complexo e apesar dos abundantes estudos, a transferência dos conhecimentos obtidos a partir dessa variedade de animais e de outros modelos de alcoolismo experimental para o ser humano deve ser ainda cautelosa e paulatinamente progressiva (BELL et al., 2017; ISRAEL et al., 2017).

2. JUSTIFICATIVA

O alcoolismo é um grande problema de saúde pública. Sobre o consumo de etanol e sua interação com a cafeína pouco se conhece acerca dessa relação complexa e multifacetada, sendo a cafeína um dos psicoestimulantes mais consumido mundialmente. Sabe-se que ambas as substâncias tem ação sobre o SNC e que, particularmente, o cerebelo é alvo reconhecido da ação do etanol, órgão de grande potencial funcional, principalmente relacionado à coordenação das atividades motoras. Na tentativa de se entender mais sobre a ação do álcool no SNC e a sua interação com outras substâncias, o presente estudo relaciona os processos inflamatórios decorrentes do consumo crônico do etanol com a modulação a que podem ser sujeitos, visando a sua possível atenuação através da ação das vias adenosinérgicas, estimuladas pelo consumo de cafeína. Os estudos que correlacionam as vias adenosinérgicas com as vias inflamatórias, e especificamente dentro do SNC, são ainda escassos.

Nesse contexto, surgem ainda os microRNAs como reguladores pós-transcricionais, em suas vias canônicas, que podem estar alterados em decorrência do consumo de etanol e da cafeína. Na literatura, informações relacionando os efeitos regulatórios desses pequenos RNAs não-codificadores com o consumo de cafeína e a regulação das vias adenosinérgicas são escassas. Nesse sentido, torna-se necessário elucidar claramente como o etanol e a cafeína alteram a expressão desses microRNAs e como eles podem participar aumentando ou suplantando a expressão de marcadores inflamatórios em geral. O maior entendimento do comportamento dos microRNAs pode proporcionar novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos relacionados ao alcoolismo e, portanto, faz-se necessária uma maior investigação. Nesse trabalho, foi proposta análise de miRNAs em suas correlações com as vias inflamatórias e adenosinérgicas nos animais UChB. A variedade de ratos UChB, geneticamente selecionada a partir do rato Wistar, constitui modelo seguro para as análises relacionadas aos efeitos do etanol sobre o organismo vivo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral do presente estudo foi o de detectar alterações das expressões de genes, microRNAs e proteínas relacionados aos processos inflamatórios e as vias adenosinérgicas do cerebelo a partir da interação entre etanol e cafeína. Além disso, objetivou-se a imunolocalização no cerebelo de diferentes moléculas relacionadas à inflamação e às vias adenosinérgicas.

3.2. Objetivos Específicos

- a. Reconhecer as alterações das expressões de genes, proteínas e microRNAs relacionados aos processos inflamatórios e sistema adenosinérgico no cerebelo a partir do consumo de etanol e da interação entre etanol e cafeína;
- b. Caracterizar diferencialmente a expressão dos marcadores escolhidos nas diferentes camadas do tecido cerebelar;
- c. Reconhecer possíveis divergências entre a expressão gênica dos marcadores e seus respectivos níveis proteicos e estabelecer possíveis relações com os níveis de expressão dos microRNAs escolhidos para análise;
- d. Identificar possíveis marcadores moleculares séricos relacionados ao uso do etanol e cafeína para diagnóstico e desenvolvimento de futuros alvos terapêuticos;

4. ARTIGO CIENTÍFICO I

Efeito do consumo de etanol e cafeína sobre a expressão de miRNAs no tecido cerebelar e no plasma sanguíneo de ratos UChB

Ethanol and caffeine consumption modulate the expression of miRNAs in cerebellar tissue and plasma of UChB rats

I. M. U. Rossetto; V. H. A. Cagnon; F. S. N. Lizarte**; L. F. Tirapelli**; D. P. C. Tirapelli**, R. M. S. Arantes*; L. G. A. Chuffa***; F. E. Martinez***, M. Martinez*

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

*Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

** Departamento de Cirurgia e Anatomia, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

*** Departamento de Anatomia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

Palavras-chave: cafeína, cerebelo, etanol, miRNA, plasma, UChB rats.

Autor correspondente: Isabela Maria Urra Rossetto, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia (IB), UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, CEP:: 13083-862, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, Campinas, SP – BraSil. Telefone: +55 (19) 35216103, Fax: +55 (14) 3815-3744. Email: isabela.urra.rossetto@gmail.com

Revista de interesse: LIFE SCIENCES (Elsevier)

RESUMO

O consumo de etanol leva a neuroinflamação no Sistema Nervoso Central, sendo o cerebelo um dos órgão mais afetados. A cafeína apresenta importantes efeitos bioativos em níveis teciduais e sistêmicos, tendo sido relatada sua ação como possível atenuadora da resposta inflamatória. Os miRNAs afetam amplamente a função celular e fisiológica e podem mostrar-se alterados após o consumo de etanol e de outras substâncias, estando ligados à modulação da resposta inflamatória. O objetivo do presente estudo foi verificar modificações na expressão de miRNAs, teciduais e circulantes, frente ao consumo crônico de etanol e cafeína. Ratos UChB e Wistar foram divididos em três grupos (n=10/grupo): 1. UChB (ratos UChB que receberam solução de etanol a 10% e água *ad libitum*); 2. UChB+cafeína (ratos UChB que receberam solução de etanol a 10% + cafeína 3g/L e água *ad libitum*); 3. Controle (ratos Wistar que receberam água *ad libitum*). O tecido cerebelar e o plasma sanguíneo dos animais foram coletados e processados através de RT-PCR para os miRNAs -155-5p, -146a-5p, -126-3p, -132-3p, -339-5p. Aumento da expressão de todos os miRNAs teciduais analisados foi observado para o grupo UChB e redução da expressão dos mesmos em níveis comparáveis ao do grupo Controle para o grupo UChB+cafeína. No plasma sanguíneo, a cafeína elevou consideravelmente o nível dos *miR-126-3p* e *miR-132-3p* e diminuiu os níveis do *miR-155-5p*. O consumo de etanol elevou a expressão do *miR-146a-5p* e diminuiu os níveis do *miR-339-5p*. Concluiu-se que tanto o consumo de etanol quanto de cafeína foram capazes de modular a expressão de miRNAs relacionados ao processo inflamatório no tecido e no plasma dos animais UChB e que os níveis plasmáticos dos miRNAs analisados não refletiram os níveis teciduais dos mesmos. O etanol estabeleceu processo inflamatório e a cafeína atuou como neuroprotetora do tecido cerebelar.

ABSTRACT

Ethanol consumption leads to neuroinflammation in the Central Nervous System, with the cerebellum being one of the most affected structure. Caffeine has important bioactive effects at the tissue and systemic levels and its action has been reported as a possible attenuator of the inflammatory response. MiRNAs affect cellular and physiological function and may be altered after consumption of ethanol and other substances, being linked to the modulation of the inflammatory response. The objective of the present study was to verify changes in the expression of miRNAs, tissue and circulating, in face of the chronic consumption of ethanol and caffeine. UChB and Wistar rats, males at 5 months of age, were divided into the following groups (n = 10 / group): 1. UChB (UChB rats receiving 10% ethanol solution and water ad libitum); 2. UChB + caffeine (UChB rats receiving 10% ethanol solution + 3g / L caffeine and water ad libitum); 3. Control (Wistar rats receiving water ad libitum). The cerebellar tissue and plasma of the animals were collected and processed by RT-PCR for the *miRNAs -155-5p, -146a-5p, -126-3p, -132-3p, -339-5p*. Increased expression of all the analyzed miRNAs was observed for the cerebellar tissue in UChB group and reduced expression of them at levels comparable to the Control group for the UChB + caffeine group. In plasma, caffeine significantly elevated the level of *miR-126-3p* and *miR-132-3p* and decreased *miR-155-5p* levels. Consumption of ethanol increased *miR-146a-5p* expression and decreased *miR-339-5p* levels. It was concluded that both ethanol and caffeine consumption were able to modulate the expression of miRNAs related to the inflammatory process in the tissue and plasma of the UchB. The plasma levels of the miRNAs analyzed did not reflect the tissue levels of the same. Ethanol established an inflammatory process and caffeine acted as a neuroprotective of cerebellar tissue.

4.1. INTRODUÇÃO

A ingestão de bebidas alcoólicas pelos seres humanos faz parte dos hábitos de diversas sociedades, correlacionando prazer, razões comportamentais e rituais (POLI et al., 2013). Consumir etanol de forma indiscriminada é um dos principais fatores de riscos à saúde, sendo tal substância responsável por 5,9% do total de mortes no mundo, 7,6% para homens e 4,0% para mulheres, a cada ano. As principais causas de mortes associadas ao consumo de etanol incluem doenças cardiovasculares e diabetes (33,4%), doenças gastrintestinais (16,2%) e cânceres (12,5%). A isso somam-se as desordens neuropsiquiátricas, uma vez que o etanol é uma substância psicoativa capaz de gerar dependência (OMS, 2018).

O etanol é considerado uma neurotoxina capaz de alterar as propriedades físico-químicas das membranas plasmáticas, afetando a embriogênese, migração e diferenciação neuronal (PEANA et al., 2016). Os efeitos da exposição crônica e aguda ao etanol no SNC encontram-se bem documentados, principalmente quando relacionados ao encéfalo imaturo, no que se refere aos transtornos do espectro alcoólico fetal. Dentre as condições mais comuns desse transtorno, destaca-se o aspecto neurológico comumente composto por microencefalia, anormalidades da medula espinhal, mal-formações do corpo caloso, cerebelo, núcleo caudado e hipocampo (DENNY;COLES; BLITZ; 2017).

Os efeitos pós-natais do consumo de etanol, no entanto, são menos estudados, mas algumas das consequências decorrentes do uso de tal substância são evidentes em todo encéfalo, como o patológico alargamento dos sulcos e afilamento dos giros pela perda de elementos celulares da camada cortical e da substância branca através de processos de morte celular, tendo em destaque a apoptose (WANG; WANG, 2015). Sendo as funções dos neurônios cerebelares rigidamente controladas por *inputs* inibitórios GABAérgicos providos pelos interneurônios localizados nas camadas granular e molecular (LUO, 2015), a ação central do etanol a partir dos receptores GABA_A elucida e justifica o envolvimento do cerebelo nas diversas alterações resultantes da exposição a essa droga, sendo afetadas as diversas camadas celulares que compõem a citoarquitetura cerebelar (PEANA et al., 2016) e que são basicamente três, quando observa-se o córtex cerebelar: a camada molecular, mais superficial, seguida pela camada de células de Purkinje e pela camada granular, mais profunda (VOZEH, 2016).

Quanto ao efeito direto do etanol nas camadas que compõem o córtex cerebelar, tem sido relatada a susceptibilidade dos neurônios de Purkinje, Golgi e Granulares a variações agudas e

crônicas dos níveis sanguíneos de etanol, em diferentes idades (GHIMIRE et al., 2009; BAGHERI et al., 2015). Modificações na estrutura celular foram observadas após consumo crônico de etanol em ratos, resultando em dilatação do retículo endoplasmático liso nos neurônios de Purkinje, processo acompanhado por morte neuronal ou apoptose axonal (DLUGOS, 2015). O cerebelo de ratos adultos UChA apresentou neurônios granulares e de Purkinje com núcleos apoptóticos, citoplasma com acúmulo de gotas lipídicas e desorganização da substância branca (OLIVEIRA et al., 2014).

Além das modificações ultraestruturais, a ingestão de etanol aumenta os níveis cerebrais de moléculas reconhecidamente envolvidas com a resposta imune, evidenciando a instalação de processo de neuroinflamação (CREWS et al., 2017). Há substanciais evidências que indicam que o consumo crônico de etanol aumenta o nível de citocinas no SNC (CREWS et al., 2006). Em ratos submetidos ao consumo crônico de etanol houve aumento da expressão de iNOS, COX-2 e IL-1b, além do aumento de três das maiores famílias de quinases estressoras (ERK 1/2, p38 and JNK) (VALLES et al., 2004). Eventos similares ocorreram com macrófagos tratados *in vitro* com níveis moderados (10-50 mM) de álcool (FERNANDEZ-LIZARBE et al., 2008).

A cafeína, uma xantina alcaloide, é uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo (FREDHOLM; YANG; WANG, 2017). É encontrada em uma ampla variedade de alimentos e bebidas, como refrigerantes, chocolates, cafés e chás. Suas ações sobre o comportamento humano têm sido objeto de estudos há décadas e ainda hoje persistem debates científicos sobre seus efeitos benéficos ou deletérios acerca dos sistemas e funções do organismo (DE MEJIA; RAMIREZ-MARES, 2014). A cafeína é consumida, principalmente, por suas propriedades estimulantes (DOEPKER et al., 2016) e apresenta ação farmacológica variada, provocando alterações reconhecidas no SNC, no sistema cardiovascular e na homeostase do cálcio (DE MARIA; MOREIRA, 2007). O efeito estimulante da cafeína deve-se ao seu papel antagonista não-seletivo dos receptores adenosinérgicos A1, A2a, A2b e A3, tendo maior destaque a participação dos dois primeiros. Assim, tais receptores participam da composição do sistema adenosinérgico, presente também no encéfalo humano, onde é reconhecido como um modulador da neurotransmissão e da resposta inflamatória, além de respostas de outras naturezas (WARDAS, 2002).

Uma das formas de combate à neuroinflamação seria através da modulação da expressão de miRNAs. Em um estudo de revisão, Su e colaboradores (2016) observaram que a expressão

alterada de microRNAs foi identificada em diversas condições patológicas, incluindo a neuroinflamação, neurodegeneração e doenças auto-imunes. Evidências sugerem os microRNAs como moléculas centrais no controle da neuroinflamação, sendo conhecidos principalmente por sua capacidade de modificar o estados das células microgлияis, induzindo-as à atividade ou a quiescência (CREWS et al.; 2017).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNAs não-codificantes que afetam amplamente a função celular e fisiológica em organismos multicelulares (BARTEL, 2004). São compostos por aproximadamente 21 a 23 nucleotídeos, regulando a tradução de RNAs específicos através da ligação complementar a sequências reguladoras do RNA, levando à degradação ou à desestabilização do mRNA. São cerca de 5000 os microRNAs existentes no humano, sendo que cada um deles é capaz de se ligar a uma média de 200 mRNAs (BARTEL, 2004; GAUDET et al., 2017). Assim, é possível que os pequenos RNAs sirvam como "mestres" reguladores da função celular (MIRANDA et al., 2010).

Não apenas os miRNAs teciduais podem estar alterados após o consumo de etanol e outras substâncias, mas também a concentração dos miRNAs circulantes é variável. Ten Berg et al. (2018) verificaram alterações de miRNAs séricos após consumo social irrestrito de etanol em homens jovens. Um total de 1305 miRNAs foram identificados no plasma desses indivíduos e sequenciados e, dentre eles, 265 miRNAs encontraram-se significativamente elevados após o consumo.

As variedades de ratos UChA (Abstainer rat) e UChB (Bibulous rat) são modelos de alcoolismo experimental, selecionados a partir do rato Wistar durante a década de 50, na Universidade do Chile, de onde se originou o nome UCh (MARDONES; SEGOVIA-RIQUELME, 1983; QUINTANILLA et al., 2006). Os ratos UChA possuem perfil de baixo consumo voluntário (0,1-2 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo ao dia) e os ratos UChB, alto consumo voluntário (5-7 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo ao dia), bem estabelecidos pelo trabalho pioneiro de Mardones na Universidade do Chile (MARDONES; SEGOVIA; HEDERRA, 1953). Assim, o presente estudo tem como objetivo detectar alterações das expressões dos *microRNAs -155-5p, -146a-5p, -126-3p, 132-3p e -339-5p* cerebelares e plasmáticos, relacionados ao processo inflamatório a partir da interação entre etanol e cafeína no modelo animal de alcoolismo crônico UChB.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Procedimentos experimentais

No presente estudo, foi utilizado um total de 20 ratos adultos da variedade UChB, do sexo masculino, com cinco meses de idade e 10 ratos Wistar, também do sexo masculino, com cinco meses de idade. Durante o estudo, os animais receberam dieta sólida (ração Purina) e água "ad libitum", sendo alojados em caixas individuais com fundo sólido e forradas com maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de luz e 12h de escuro) e temperatura (20 à 25°C). Os animais foram divididos em três grupos experimentais (N=10): (1º: grupo UChB) – grupo de ratos UChB de consumo voluntário de etanol a 10% (água + etanol, 7g de etanol/kg de peso corpóreo/dia), (2º: grupo UChB+cafeína) – grupo de ratos UChB de consumo voluntário de etanol a 10% (água + etanol, 7g de etanol/kg de peso corpóreo/dia + 3g de cafeína a cada litro) e (3º: grupo Controle) – grupo de ratos Wistar com o consumo de água "ad libitum". A seleção dos animais bebedores de etanol e padronização da variedade UChB foi realizada de acordo com o protocolo de Mardones e Segovia-Riquelme (1983). Do fim do período da seleção até a eutanásia (80 aos 150 dias de idade), o consumo de etanol foi medido a cada 7 dias. Os ratos do grupo UChB+cafeína permaneceram 55 dias consecutivos (95 aos 150 dias) ingerindo voluntariamente a solução de etanol a 10% adicionada de cafeína. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unicamp (protocolo 4651-1/2017) e da UFSCar (protocolo 9895280815). Após o período de experimentação, a eutanásia dos animais foi realizada por sobredosagem de anestesia (Xilazina 300 mg/kg e Cetamina 40 mg/kg, via intraperitoneal). Amostras do cerebelo e 1 ml de sangue de cada animal (retirado da artéria ventral da cauda) foram destinadas às técnicas de biologia molecular, sendo armazenadas em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80°C.

4.2.2. Expressões dos *microRNAs* -155, -132, -126, -146a e -339-5 no tecido cerebelar

Em cada amostra congelada foi adicionado 250µl de PBS e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). O fragmento de tecido cerebelar foi homogeneizado com a utilização de um aparelho Politron®. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, acrescentou-se 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada por 15 minutos a 4°C e 13.200 rpm e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos

tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 4°C e 13.200 rpm, desprezou-se o sobrenadante. A seguir, acrescentou-se 1000µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 5 minutos a 13.200 rpm. A fase superior foi desprezada e o pellet seco dissolvido com água tratada com DEPC por 15 minutos. Esse material, em seguida, foi aliquoteado, identificado e armazenado a -80°C. Cada amostra, ao final da etapa descrita acima, foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA para verificação da integridade do RNA obtido. Para a síntese do cDNA (DNA complementar) a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, de acordo com as instruções do fabricante para a síntese do cDNA. Para cada 1µg de RNA, foi adicionado 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0µl de dNTP's; 2,5µl de Random Primers e 1,25µl da enzima MultiScribe™, completando com água DEPC o volume final de 20µl. Realizou-se a quantificação da expressão diferencial dos miRNAs escolhidos *rno-miR-155-5p* (Assay ID 002571), *rno-miR-132-3p* (Assay ID 000457), *rno-miR-126-3p* (Assay ID 002228), *rno-miR-146a-5p* (Assay 000468), *rno-miR-339-5p* (Assay ID 002257) e utilizou-se como normatizador o U6.

A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RT-PCR), com a utilização da TaqMan Master Mix (Applied Biosystems). Para a análise quantitativa da expressão dos genes supracitados, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay-on-demand, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems). Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) foi utilizado juntamente com o software Sequence Detection System para a obtenção dos valores de CT. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi realizada em um volume final de 10µl, utilizando 5 µl do reagente específico TaqMan Master Mix, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA diluído 1:10. Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de ΔCT . As condições padrão para amplificação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão, simultâneos).

4.2.3. Expressão sérica dos *microRNAs* -155, -132, -126, -146a e -339-5p

As amostras de sangue foram coletadas em tubo com EDTA e centrifugadas 10' por 2500 rpm. O plasma (fase superior) foi transferida para outro tubo e foram adicionados 250ml de PBS e 750ml de Trizol (Invitrogen, EUA) para congelamento a -80 °C. Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA. Para a síntese do cDNA (DNA complementar) dos miRNAs, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de RT Buffer; seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de Primers específicos (miRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e, em seguida, realizou-se a 4°C. Para o PCR em tempo real, foi utilizado 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a expressão diferencial dos microRNAs utilizando o sistema disponível comercialmente TaqMan Assay-on-demand, composto por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems) para a análise quantitativa da expressão dos *microRNAs* -155, -132, -126, -146a, -339-5p (descritas no item 4.3.2). Utilizou-se como normalizador o U6.

4.2.4. Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram exportados para Excel e transferidos para o software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA), utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística. Todos os valores obtidos para cada técnica foram considerados paramétricos dentro do grupo analisado através do teste de distribuição normal Shapiro-Wilk. Para as análises de significância estatística entre os grupos, foi utilizado o teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

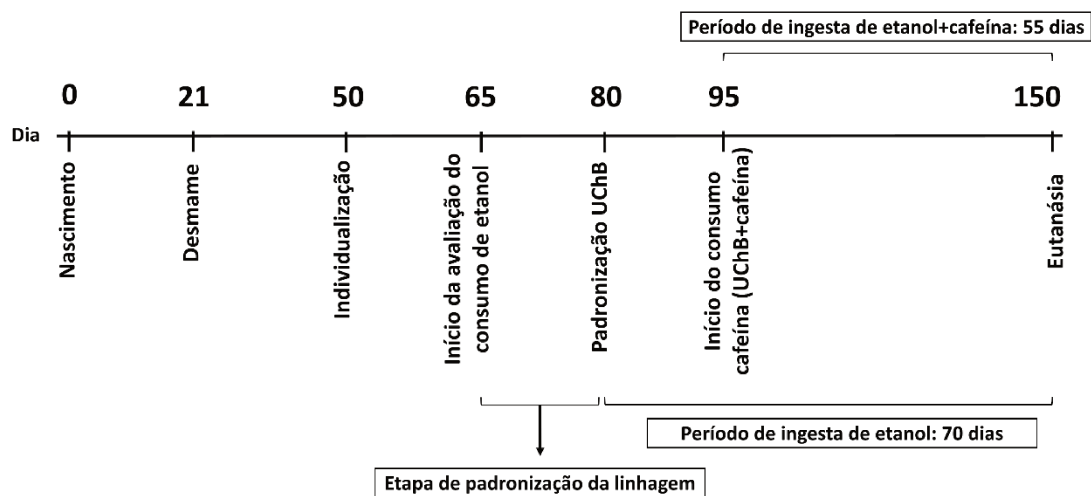


Figura 1. Desenho experimental para os grupos UChB e UChB+cafeína a partir do nascimento dos animais e da padronização da linhagem. Modificado de Martinez et al. (2018).

4.3.RESULTADOS

4.3.1. Cafeína reverteu o aumento da expressão de miRNAs após o consumo de etanol no cerebelo

Para os miRNAs mensurados no tecido cerebelar, todos tiveram aumento significativo em sua expressão no grupo UChB, após o consumo de etanol. Para todos eles também houve redução da expressão no grupo UChB+cafeína quando comparados ao do grupo Controle. Apenas para o *miR-146a-5p* houve diminuição dos níveis de expressão no grupo UChB+cafeína para níveis menores do que o do grupo Controle (Fig.2).

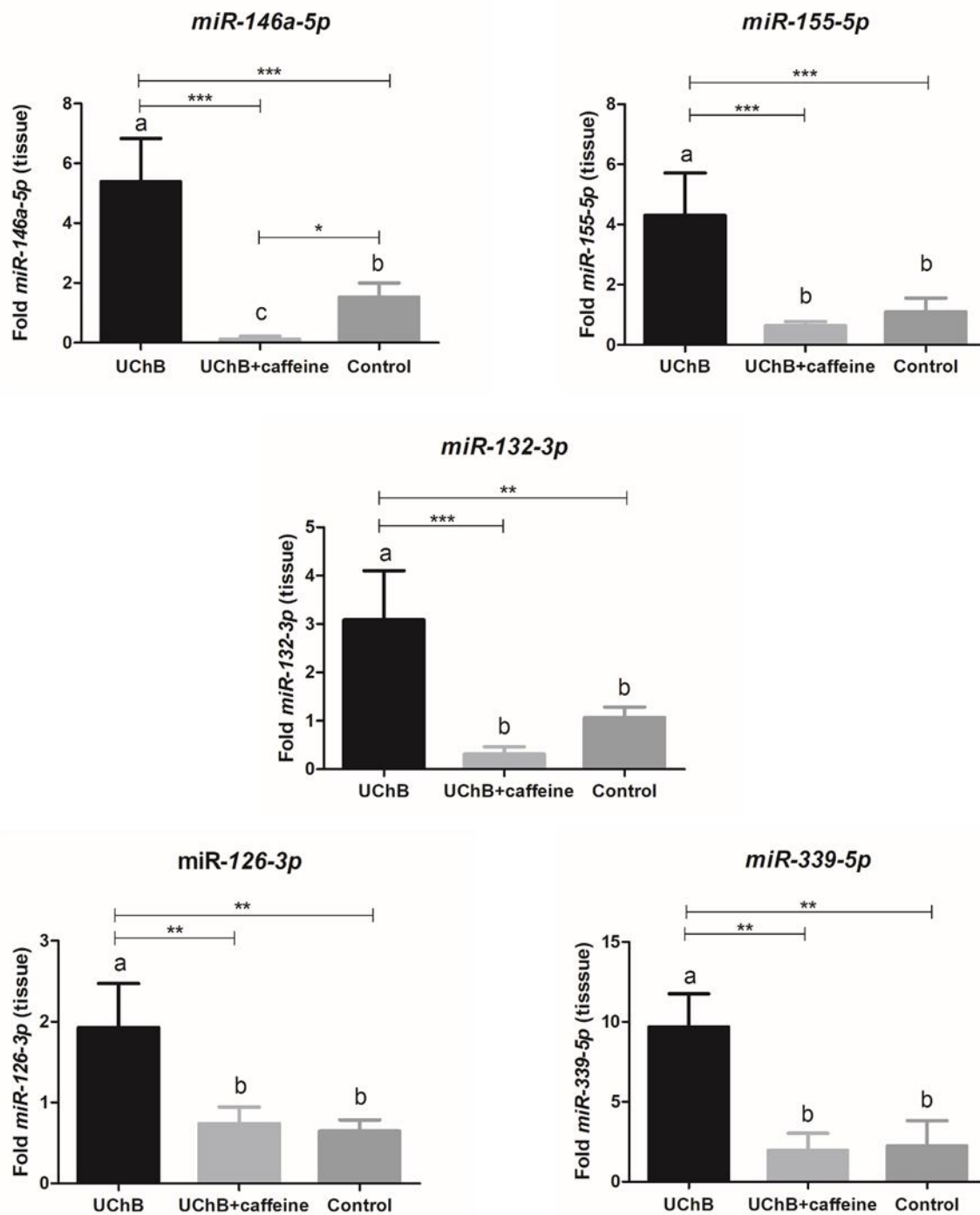


Figura 2. Análises das expressões dos *miR-155-5p*, *-146a-5p*, *-126-3p*, *-132-3p*, *-339-5p* no cerebelo dos animais. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.2. Cafeína elevou o nível de miRNAs circulantes

O consumo de cafeína elevou os níveis dos *miR-126-3p* e *miR-132-3p* no grupo UChB+cafeína. Aumento significativo foi observado para o *miR-126-3p* que demonstrou estar aproximadamente quarenta e cinco vezes maior após o consumo de etanol e cafeína do que após o consumo isolado de etanol. Para o *miR-132-3p*, a expressão no grupo UChB quando comparada ao grupo UChB+cafeína foi encontrada oito vezes menor (Fig. 4).

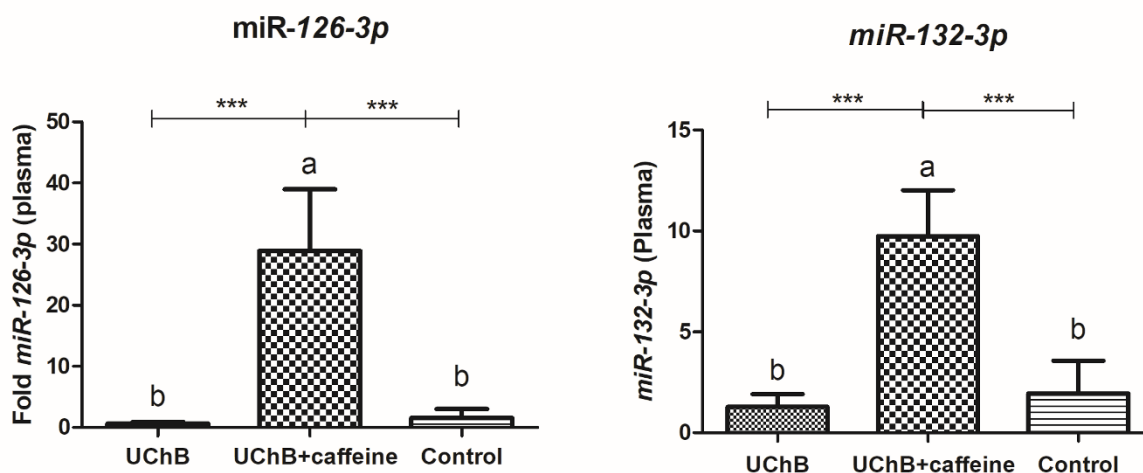


Figura 3. Análises das expressões dos *miR-126-3p* e *miR-132-3p* no plasma dos animais. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.3. O consumo de etanol influenciou a expressão de miRNAs circulantes

A expressão do *miR-146a-5p* no plasma dos animais foi elevada após o consumo de etanol. O consumo de cafeína foi capaz de reduzir este miRNA a níveis comparáveis ao do grupo controle. Para o *miRNA-155-5p* houve diminuição de sua expressão para o grupo UChB+cafeína. O *miR-339-5p* teve expressão diferencial para cada um dos grupos analisados, sendo que o consumo de etanol e de cafeína atenuou sua expressão.

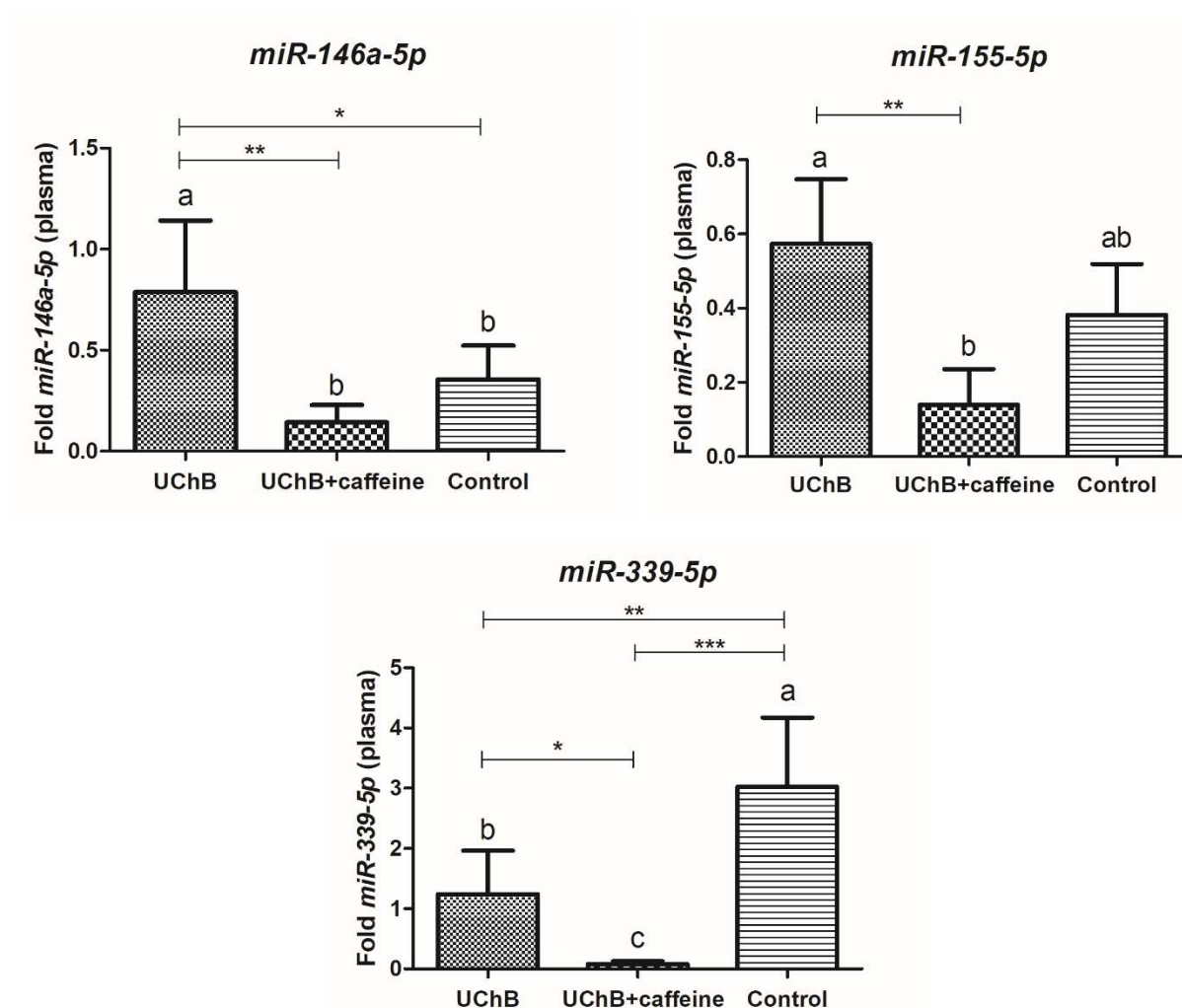


Figura 4. Análises das expressões dos *miR-146a-5p*, *-155-5p*, *-339-5p* no plasma dos animais. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4. DISCUSSÃO

O consumo de etanol leva a mudanças neuroinflamatórias no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo (ALFONSO-LOECHES et al.; 2010). Os miRNAs tem papel notável na regulação epigenética do processo inflamatório dentro do SNC, levando a patogênese de doenças cujo eixo é claramente inflamatório, como a doença de Alzheimer ou a esclerose múltipla (KARTHIKEYAN et al., 2016). Durante o período de injúria no tecido neural, diversas vias de sinalização ativam micróglia e astrócitos, contribuindo para o estado de inflamação, um dos principais contribuintes para a iniciação e progressão da neurodegeneração (NEAL; RICHADSON, 2018).

O presente estudo demonstrou aumento na expressão dos miRNAs *-155-5p*, *-146a-5p*, *-126-3p*, *-132-3p*, *-339-5p* presentes no tecido cerebelar para o grupo UChB. Com isso, pode-se inferir que o consumo crônico de etanol é capaz de exercer forte influência sobre o tecido neural. No estudo de Lewhol et al. (2011) o nível de microRNAs foi encontrado significativamente aumentado no córtex pré-frontal de humanos consumidores crônicos de etanol, dentre eles o *miR-339-5p* e o *miR-146a*. Esse estudo sugeriu que a redução da expressão gênica decorrente do consumo de etanol em humanos poderia ter como uma das causas o aumento na expressão de miRNAs e que processos celulares fundamentais para a plasticidade neuronal representariam grande parte dos alvos regulados pelos miRNAs analisados.

Um dos miRNAs ligados à ativação microglial trata-se do *miR-155-5p*, que tem como um dos alvos a SOCS-1 (supressor of cytokine signalling-1), proteína que negativamente regula a resposta inflamatória nesse tipo celular. O aumento desse miRNA leva, portanto, ao aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (CARDOSO et al.; 2012). O *miR-155-5p* é um miRNA reconhecidamente pró-inflamatório e cuja presença na célula se mostra crítica para a efetividade das respostas advindas de macrófagos e células T. Nos macrófagos, o *miRNA-155* é estimulado a partir de ligantes dos receptores tipo toll (TLRs) e por citocinas como o interferon- γ (IFN- γ) (GAUDET et al., 2017). Lippai e colaboradores (2013) mostraram que a deficiência do *miRNA-155* protege contra a indução, pelo etanol, do aumento de citocinas pró-inflamatórias no cerebelo de camundongos, protegendo também do aumento da produção de NFkB. Além disso, concluíram que a indução da expressão do *miRNA-155* é dependente do TLR4 no cerebelo exposto ao etanol de maneira crônica, mostrando que a deleção desse miR pode ter papel neuroprotetor importante. Os resultados do presente estudo corroboram com o reportado pela literatura, uma vez que houve aumento da expressão desse miRNA em decorrência do consumo de etanol. A ingestão de cafeína atenuou a expressão desse miRNA para o grupo UChB+Cafeína a níveis comparáveis ao do grupo Controle, sugerindo a regressão do estado inflamatório estabelecido no grupo UChB.

Nesse sentido, alguns miRNAs desempenham papel de resolutividade do processo inflamatório, dentre eles o *miR-146a-5p*. A superexpressão desse miRNA em células microgliais demonstrou induzir aumento da IL-10, essencial para a contenção do estado de ativação da inflamação (SABA et al.; 2012). Em linhagem de astrócitos tratados com IL-1 β , a maior expressão do *miR-146a* relacionou-se à regulação negativa do processo inflamatório ao diminuir fatores como a IL-6 e a COX-2. O *miR-146a-5p* tem como alvos diretos os genes relacionados à adaptação do

MyD88, IRAK-1 e TRAF-6, componentes essenciais para a ativação da via do NFkB, via ativação dos TLR's (IVER et al.; 2012). Assim, o aumento do *miR-146a* condiz com o aumento da expressão do NFkB, tratando-se de uma tentativa de suprimir a produção desse fator de transcrição (CARDOSO; GUEDES; DE LIMA, 2016; IVER et al.; 2012). Após o consumo de etanol, houve aumento da expressão do *miR-146a* no tecido cerebelar em resposta ao provável aumento da inflamação, indiciado pela aumento da expressão do *miR-155* nesse mesmo grupo. Além disso, o consumo de cafeína foi capaz de reduzir a expressão do *miR-146a* a nível menor do que o encontrado para o grupo Controle, sinalizando para a não necessidade do tecido conter o estado inflamatório. Relata-se aumento da expressão do *miR-155-5p* concomitantemente ao aumento da *miR-146a-5p* no contexto inflamatório, apontando para uma possível tentativa do tecido de resolver o estabelecimento do processo de inflamação (GAUDET et al.; 2017).

No estudo de Lippai e colaboradores (2013) observou-se que o consumo crônico de etanol aumentou os níveis cerebelares do *miRNA-132* e, de forma semelhante, houve aumento da expressão desse miRNA para o grupo UChB. No entanto, além de se relacionar ao processo inflamatório, esse miRNA é muito encontrado em terminais sinápticos neuronais, tendo ampla relação com a integridade dos campos sinápticos dos dendritos e com a plasticidade neural (KAWAHARA, 2008). Kawashima et al (2010) demonstraram que o aumento da expressão do *miR-132* eleva os níveis de receptores glutamatérgicos GluA1, GluN2A e GluN2B em cultura de neurônios corticais. Isso sugere o etanol como modulador não somente de proteínas reconhecidamente inflamatórias, mas também de proteínas estruturais, como os receptores glutamatérgicos, uma vez que no presente estudo esse miRNA mostrou-se superexpresso para o grupo UChB. Dentre os genes alvos do *miR-132*, incluem-se IRT1, AChE, PTEN, FOXO3a e p300 de acordo com o levantamento feitos por Bickers et al. (2014), concluindo-se que o aumento da expressão do *miR-132* pode estar relacionado à desordens neuropsiquiátricas.

Em adição aos resultados aqui apresentados, Zhang e colaboradores (2014) mostraram aumento do *miRNA-339-5p* em um quadro de neuroinflamação induzida pelo etanol, com o aumento significativo da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α nas células microgliais e no tecido cerebral. Esse miRNA tem como alvos prováveis as proteínas IKK- β and IKK- ϵ , reguladoras da ativação do NFkB. Além disso, esse miRNA encontra-se desregulado em processos de neurodegeneração (VALLELUNGA et al., 2014) e foi encontrado também sendo

expresso de maneira alterada no córtex cerebral de murinos durante período de dependência do etanol (NUNEZ et al., 2013).

Há poucos estudos em torno da função do *miRNA-126-3p* no encéfalo humano especificamente. Mas apesar disso, é um miRNA de grande expressão no tecido neural e sabe-se que ele tem um papel preponderante no processo de angiogênese e de manutenção da integridade do epitélio vascular, sendo importante na homeostase vascular (VAN SOLINGEN et al., 2015; YU et al., 2018). Tem ação também relacionada à resposta imune inata (BAI et al., 2014). Na inflamação, o *microRNA-126* parece suprimir produção de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais através da modulação da expressão de HMGB1 (TANG et al., 2017).

No tecido cerebelar, o grupo UChB+caféina teve a expressão de todos os miRNAs analisados reduzida a níveis menores ou comparáveis ao do grupo Controle. Dessa forma, infere-se que, a partir da perturbação inicial causada pelo consumo de etanol e evidenciada pelas alterações do grupo UChB, a caféina foi capaz de retornar a expressão dos miRNAs a níveis basais. No estudo de Varma & Kovtun (2013) relatou-se a caféina como capaz de modular a expressão de miRNAs no cristalino de ratos submetidos a dieta rica em galactose. Uma vez que a elevação de alguns miRNAs silencia genes e consequentemente desativa a tradução de proteínas, a caféina foi capaz de atenuar essa superexpressão, sendo que o seu efeito benéfico poderia ser, então, atribuído a sua habilidade de suprimir a elevação de miRNAs tóxicos e o consequente silenciamento gênico. Essa mesma lógica poderia explicar os efeitos benéficos decorrentes do consumo da caféina após o consumo de etanol no cerebelo dos ratos UChB.

Os efeitos da ingestão de etanol e caféina, no entanto, não se restringiram apenas ao tecido cerebelar. Quando analisada a expressão de miRNAs circulantes, notou-se reverberação sistêmica da ação desses pequenos RNAs. Sugere-se que os miRNAs podem agir como uma nova classe de biomarcadores para o diagnóstico e monitoramento de doenças como o câncer, doenças cardíacas, infecções e condições neurodegenerativas (BECKRIS & LEVERENEZ, 2015; MOMEM-HERAVI et al., 2015). Partindo de sua origem intracelular, miRNAs podem ser secretados extracelularmente após ação da AGO2 (HE & HANON, 2004) ou ainda ser secretados em vesículas extracelulares, os exossomos, servindo como assinaturas personalizadas dos estado de doença e refletindo a interação célula-célula (GIBBINGS et al., 2012).

Momem-Heravi et al. (2015) reportaram que quando linhagens celulares, modelos animais e pacientes com hepatite alcoólica eram expostos ao etanol, estabelecia-se aumento no número de

exossomos circulantes, com alterações também na carga de miRNAs. Uma vez presentes na corrente sanguínea, os miRNAs podem ter ações sistêmicas, endereçadas a uma ampla gama de órgãos e tecidos (BARTEL, 2004; BENES & CASTOLDI, 2010). A capacidade do etanol de modular o nível desses miRNAs circulantes pode refletir uma via para as alterações trazidas pelo abuso dessa substância.

Ten Berg et al. (2018) documentaram alteração de miRNAs presentes no soro de jovens adultos após exposição irrestrita ao consumo de etanol. Cerca de 1305 miRNAs foram identificados e seqüenciados e, dentre estes, 265 tiveram sua expressão aumentada após o episódio de consumo. Os *hsa-miR-4433a-3p* e *hsa-miR-676-3p* foram identificados como miRNAs particularmente aumentados após o consumo agudo de etanol. Gardiner et al. (2016) realizaram estudo prospectivo com mulheres grávidas pacientes de clínicas e maternidade que consumiram etanol durante a gravidez e reportaram alterações nos miRNAs séricos *125a-5p*, *-602*, *-126*, and *-3180-3p*.

O consumo de etanol elevou os níveis dos *miRs-146a* e *-155* no plasma dos animais UChB. Os níveis séricos desses miRNAs foram relatados elevados em modelo de doença hepática alcoólica induzida (BALA et al.; 2012; MCDANIEL et al.; 2014). A expressão desses miRNAs circulantes se mostrou elevada para o *miR-155* e atenuada para o *miR-146a* em pacientes portadores da Doença de Parkinson, podendo a sua assinatura estar relacionada ao estágio da neurodegeneração (CAGGIU et al.; 2018).

O consumo de cafeína elevou os níveis dos *miR-126-3p* e *-132-3p* a níveis superiores aos comparados com o grupo Controle e UChB, mostrando que esses miRNAs foram especificamente alterados pelo consumo da cafeína. Poucos estudos relatam a modulação da cafeína sobre miRNAs séricos, estando a maior parte deles restritos ao efeito dessa substância nos tecidos (FANG et al.; 2014). Sendo assim, é interessante observar que, apesar da maior expressão dos *miR-126-3p* e *-132-3p* no tecido cerebelar para o grupo UChB, houve maior expressão sistêmica desses miRNAs para o grupo UChB+cafeína, sinalizando para o fato de que, a expressão de miRNAs em um determinado tecido nem sempre reflete o seu efeito sistêmico, como reportado pelo estudo de Sierzega et al. (2017).

A cafeína está relacionada à regulação da expressão de miRNAs e é uma substância reconhecida como uma xantina alcaloide de grande potencial antioxidante, capaz de inibir alterações causadas por estresse oxidativo durante a transcrição do DNA (SHI, PABBOON & SCOTTO.; 2015). A sua ação nos tecidos é mediada pelos receptores adenosinérgicos, sendo a

adenosina uma molécula endógena chave que regula a função tecidual através da proteína G acoplada aos receptores adenosinérgicos. Muitas células imunes expressam esses receptores e são responsivas aos efeitos modulatórios da adenosina no organismo (HASKÓ et al., 2008).

No estudo de Martinez et al. (2018), a análise da ação do consumo concomitante de etanol e cafeína no cerebelo de ratos UChB mostrou relevante capacidade da cafeína em reverter o processo apoptótico causado pelo etanol às células Granulares, de Golgi e ainda nas células da Glia do cerebelo, suprimindo em grande parte a expressão de Caspase-3 e intensificando a expressão de XIAP. No entanto, pouco ainda se sabe sobre como a cafeína é capaz de agir para a atenuação da perda neuronal. Acredita-se que para o retardo dos processos neurodegenerativos, uma das formas, além da diminuição da taxa de apoptose, seja, primeiramente, pelo combate à neuroinflamação (ULLAH et al., 2015; MADEIRA et al., 2016) e o presente trabalho demonstrou que há regulação exercida pela cafeína sobre os miRNAs.

4.5. CONCLUSÃO

Assim, a partir dos presentes resultados concluímos que tanto o consumo de etanol quanto de cafeína foram capazes de interferir na expressão de miRNAs relacionados ao processo inflamatório no cerebelo e no plasma sanguíneo dos animais UChB, sendo que o etanol estabeleceu processo inflamatório e a cafeína atuou como neuroprotetora do tecido cerebelar.

Também, concluímos que os níveis plasmáticos dos miRNAs analisados nem sempre refletiram os níveis cerebelares dos mesmos, sugerindo que as análises desses marcadores devem sempre ser avaliadas como parâmetros complementares na sinalização de diferentes processos biológicos.

AGRADECIMENTOS

A Wanderley Thiago da Silva pelo cuidado dos animais durante o período de experimentação e a Gelson Rodrigues pelo suporte técnico.

AUXÍLIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2016/07410-8) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não houve nenhum conflito de interesse.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFONSO-LOECHES, S.; PASCUAL-LUCAS, M.; BLANCO, A. M.; SANCHEZ-VERA, I.; GUERRI, C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. **Journal of Neuroscience**, v.30, p. 8285–8295, 2010.

BAGHERI, F. et al. Melatonin prevents oxidative damage induced by maternal ethanol administration and reduces homocysteine in the cerebellum of rat pups. **Behavioral Brain Research**, v. 287, p. 215-225, 2015.

BAI, Y. et al. Functions of miR-126 and innate immune response. **Yi chuan = Hereditas**, v. 36, n. 7, p. 631–6, 2014.

BALA, S.; PETRASEK, J.; MUNDKUR, S.; CATALANO, D.; LEVIN, I.; WARD, J.; ALAO, H.; KODYS, K.; SZABO G. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. **Hepatology**, v.56, n.5, p.1946-57, 2012.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, n.2, p.281-297, 2004.

BEKRIS, L. M.; LEVERENZ, J. B. The biomarker and therapeutic potential of miRNA in Alzheimer's disease. **Neurodegenerative Disease Management**, v.5, n.1, p.61-74, 2015.

BICKER, S.; LACKINGER, M.; WEI, K.; SCHRATT, G.; MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v, 71, n.20, p.3987-4005, 2012.

CAGGIU, E.; PAULUS, K.; MAMELI, G.; ARRU, G.; PIETRO, G.; SECHI, L. A. Differential expression of miRNA 155 and miRNA 146a in Parkinson's disease patients. **eNeurologicalSciences**, v.14, n.13, p.1-4, 2018.

CARDOSO, A. L.; GUEDES, J. R.; DE LIMA, M. C. P. Role of microRNAs in the regulation of innate immune cells under neuroinflammatory conditions. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 26, p. 1–9, 2016.

CARDOSO, A.L.; GUEDES, J.R.; PEREIRA DE ALMEIDA, L.; PEDROSO DE LIMA, M.C. miR-155 modulates microglia mediated immune response by down-regulating SOCS-1 and promoting cytokine and nitric oxide production. **Immunology**, v.135, n.1, p.73-88, 2013..

CREWS, F. T. et al. The role of neuroimmune signaling in alcoholism. **Neuropharmacology**, p. 1–18, 2017.

CREWS, F.T. et al, Cytokines and alcohol. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.30, p.720-730, 2006.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99–105, 2007.

DE MEJIA, E. G.; RAMIREZ-MARES, M. V. Impact of caffeine and coffee on our health. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 10, p. 489–492, 2014.

DENNY, L.; COLES, S.; BLITZ, R. Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **American family physician**, v. 96, n. 8, p. 515-522, 2017.

DLUGOS, C. A. Ethanol-induced alterations in Purkinje neuron dendrites in adult and aging rats: a review. **Cerebellum**, v. 14, n. 4, p. 466-473, 2015.

DOEPKER, C. et al. Caffeine: Friend or Foe? **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, p.117-137, 2016.

FANG, X. et al. Caffeine exposure alters cardiac gene expression in embryonic cardiomyocytes. **American Journal of Physiology: Regulatory, integrative and comparative physiology**, v.15, p.1471-87, 2014.

FERNANDEZ-LIZARBE, S. et al. Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. **Molecular Immunology**, v.45, p.2007–2016, 2008.

FERNANDEZ-LIZARBE, S.; MONTESINOS, J.; GUERRI, C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, n. 2, p. 261–273, 2013.

FREDHOLM, B. B.; YANG, J.; WANG, Y. Low, but not high, dose caffeine is a readily available probe for adenosine actions. **Molecular Aspects of Medicine**, v.55, p. 20-25, 2017.

GARDINER, A. S. et al. Alcohol use during pregnancy is associated with specific alterations in microRNA levels in maternal serum. **Alcoholism: Clinical and experimental research**, v. 40, n. 4, 2016.

GAUDET, A. D. et al. MicroRNAs: Roles in regulating neuroinflammation. **The Neuroscientist**, v.24, n.2, p. 221-245, 2018.

GHIMIRE, S. R. et al. Effect of maternal alcohol consumption on cerebellum of rat pups: a histological study. **Nepal Medical College journal**, v. 11, n. 4, p. 268–71, 2009.

GIBBINGS, D.; MOSTOWY, S.; JAY, F.; SCHWAB, Y.; COSSART, P.; VOINNET, O. Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. **Nature Cell Biology**, v.14, n.12, p.1314-21, 2012.

HASKÓ, G. et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 9, p. 759–70, 2008.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n.7, p. 522-31, 2004.

IYER, A.; ZUROLO, E.; PRABOWO, A.; FLUITER, K.; SPLIET, W.G.; VAN RIJEN, P.C.; GORTER, J.A.; ARONICA, E. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. **PLoS One**, v.7, n.9, e44789, 2012.

KARTHIKEYAN, A.; PATNALA, R.; JADHAV, S.P.; ENG-ANG, L.; DHEEN, S. T. MicroRNAs: key players in microglia and astrocyte mediated inflammation in CNS pathologies. **Current Medicinal Chemistry**, v.23, n.30, p.3528-3546, 2016.

KAWAHARA, Y. MicroRNAs in neurobiology. **Brain and nerve**, v. 60, n. 12, p. 1437–44, dez. 2008.

KAWASHIMA, H.; NUMAKAWA, T.; KUMAMARU, E.; ADACHI, N.; MIZUNO, H.; NINOMIYA, M.; KUNUGI, H.; HASHIDO, K. Glucocorticoid attenuates brain-derived neurotrophic factor-dependent upregulation of glutamate receptors via the suppression of microRNA-132 expression. **Neuroscience**, v.165, n.4, p.1301–1311, 2010.

LEWOHL, JOANNE M.; NUNEZ, YURY; DODD, PETER; TIWARI, GAYATRI; HARRIS, ADRON; MAYFIELD, D. Up-regulation of microRNAs in brain of human alcoholics. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 35, n. 11, p. 1928–1937, 2011.

LIPPAI, D.; BALA, S.; PETRASEK, J.; CSAK, T.; LEVIN, I.; KURT-JONES, E. A. SZABO, G. Alcohol-induced IL-1 β in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, n.94, p. 171-182, 2013.

LUO, J. Effects of ethanol on the cerebellum: Advances and prospects. **Cerebellum**, v. 14, n. 4, p. 383–385, 2015.

MADEIRA, M. H. et al. Caffeine administration prevents retinal neuroinflammation and loss of retinal ganglion cells in an animal model of glaucoma. **Scientific Reports**, v. 6, n. 27532, 2016.

MARDONES, J.; SEGOVIA, N.; HEDERRA, A. Heredity of experimental alcohol preference in rats. II. Coefficient of heredity. **Quarterly journal of studies on alcohol**, v. 14, n. 1, p. 1–2, 1953.

MARDONES, J.; SEGOVIA-RIQUELME, N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. **Neurobehavioral toxicology and teratology**, v. 5, n. 2, p. 171–8, 1983.

MARTINEZ, M. et al. Interactions of ethanol and caffeine on apoptosis in the rat cerebellum (voluntary ethanol consumers). **Cell Biology International**, v. 42, n.11, p. 1575-83, 2018.

MCDANIEL, K.; HERRERA, L.; ZHOU, T.; FRANCIS, H.; HAN, Y.; LEVINE, P.; LIN, E.; GLASER, S.; ALPINI, G.; MENG, F. The functional role of microRNAs in alcoholic liver injury. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.18, n.2, p.197-207, 2014.

MIRANDA, R. C. et al. MicroRNAs: Master regulators of ethanol abuse and toxicity? **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 34, n. 4, p. 575–587, 2010.

MOMEN-HERAVI, F. et al. Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific microRNA-122 and sensitize monocytes to LPS. **Scientific reports**, v.5, n.1, 2015a.

MOMEN-HERAVI, F. et al. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. **Journal of translational medicine**, v.13, n.1, 2015b.

NEAL, M.; RICHARDSON, J. R. Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v.1864, n.2, p.432-443, 2018.

NUNEZ, Y. O. et al. Positively correlated miRNA-mRNA regulatory networks in mouse frontal cortex during early stages of alcohol dependence. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global status report on alcohol and health. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**, 2014.

PEANA, A. et al. From ethanol to salsolinol: role of ethanol metabolites in the effects of ethanol. **Journal of Experimental Neuroscience**, v. 10, p. 137, 2016.

POLI, A. et al. Moderate alcohol use and health: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 6, p. 487–504, 2013.

QUINTANILLA, M. E. et al. The UChA and UChB rat lines: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. **Addiction Biology**, v. 11, n. 3–4, p. 310–323, 2006.

SABA, R.; GUSHUE, S.; HUZAREWICH, R.L.; MANGUIAT, K.; MEDINA, S.; ROBERTSON, C.; BOOTH, S.A. MicroRNA-146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. **PLoS One**, v. 7, n.2, e30832, 2012.

SHI, J.; PABON, K.; SCOTTO, K. W. Methylxanthines increase expression of the splicing factor SRSF2 by regulating multiple post-transcriptional mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, v.12, p.14986-5003, 2014.

SU, W.; ALOI, M. S.; GARDEN, G. A. MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 52, p. 1–8, 2016.

TANG, S.T. et al. MicroRNA-126 suppresses inflammation in endothelial cells under hyperglycemic condition by targeting HMGB1. **Vascular Pharmacology**, v.88, n.52017, 2017.

TEN BERG, P. W. et al. Attending a social event and consuming alcohol is associated with changes in serum microRNA: a before and after study in healthy adults. **Biomarkers**, v. 23, n. 8, p. 781-786, 2018.

ULLAH, F. et al. Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 114–124, 2015.

VALLELUNGA, A. et al. Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and Multiple System Atrophy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 1–10, 2014.

VALLES, S.L. et al. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. **Brain Pathology**, v.14, p.365–371, 2004.

VAN SOLINGEN, C. et al. The role of microRNA-126 in Vascular Homeostasis. **Current Vascular Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 341–51, 2015.

VARMA, S. D.; KOVTUN, S. Protective effect of caffeine against high sugar-induced transcription of microRNAs and consequent gene silencing: a study using lenses of galactosemic mice. **Molecular Vision**, v.19, p. 493-500, 2013.

VOZEH, F. Cerebellum -from J. E. Purkyně up to Contemporary Research. **Cerebellum**, v. 16, n.3, p. 691-4, 2017.

WANG, J.Z.; WANG, Z.H. Senescence may mediate conversion of tau phosphorylation-induced apoptotic escape to neurodegeneration. **Experimental Gerontology**, v. 68, p. 82–86, 2015.

WARDAS, J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 54, p. 313–326, 2002.

YU, P.; VENKAT, P.; CHOPP, M.; ZACHAREK, A.; SHEN, Y.; NING, R.; LIANG, L.; LI, W.; ZHANG, L.; LANDSCHOOT-WARD, J.; JIANG, R.; CHEN, J. Role of microRNA-126 in vascular cognitive impairment in mice. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 2018.

ZHANG, Y. et al. MiR-339-5p inhibits alcohol-induced brain inflammation through regulating NF- κ B pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 452, n. 3, p. 450–456, 2014.

5. ARTIGO CIENTÍFICO II

Efeito do consumo de etanol e cafeína sobre a expressão gênica e níveis proteicos de marcadores inflamatórios e receptores adenosinérgicos no cerebelo de ratos UChB

Ethanol and caffeine consumption alter gene expression and protein levels of inflammatory markers and adenosinergic receptors in the cerebellum of UChB rats.

I. M. U. Rossetto; V. H. A. Cagnon; L. A

. Kido; F. S. N. Lizarte**; L. F. Tirapelli**; D. P. C. Tirapelli**, L. G. A. Chuffa***; F. E. Martinez***, M. Martinez*

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

*Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São (UFSCar), São Carlos, SP, Brasil.

** Departamento de Cirurgia e Anatomia, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

*** Departamento de Anatomia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

Palavras-chave: cafeína, cerebelo, etanol, inflamação, receptores adenosinérgicos, UChB.

Autor correspondente: Isabela Maria Urra Rossetto, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia (IB), UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, CEP: 13083-862, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, Campinas, SP – Brasil. Telefone: +55 (19) 35216103, Fax: +55 (14) 3815-3744. Email: isabela.urra.rossetto@gmail.com

Revista de interesse: THE CEREBELLUM (Springer)

RESUMO

O consumo de etanol tende a aumentar os níveis de marcadores inflamatórios no Sistema Nervoso Central. A cafeína tem papel antagônico não-seletivo dos receptores adenosinérgicos. Sabe-se também que as vias adenosinérgicas desempenham ação protetora no SNC. Assim, supõe-se que o consumo de cafeína seja capaz de interferir nos processos celulares inerentes aos mecanismos inflamatórios, podendo atenuar a instalação da neuroinflamação. O objetivo do presente trabalho foi reconhecer as alterações das expressões de genes e proteínas relacionadas aos processos inflamatórios e sistema adenosinérgico no cerebelo a partir do consumo de etanol e cafeína e detectar diferencialmente a expressão dos marcadores escolhidos nas diferentes camadas do tecido cerebelar. Ratos UChB, machos com 5 meses de idade, foram divididos em três grupos (n=15/grupo): 1. UChB (ratos UChB que receberam solução de etanol a 10% e água *ad libitum*); 2. UChB+cafeína (ratos UChB que receberam solução de etanol a 10% + cafeína 3g/L e água *ad libitum*); 3. Controle (ratos Wistar que receberam água *ad libitum*). O tecido cerebelar dos animais foi coletado e processado para as técnicas de RT-PCR, Western Blotting e imunohistoquímica para os marcadores inflamatórios NFkB, TLR4, TLR2 e MyD88 e receptores adenosinérgicos A1 e A2a. O grupo UChB apresentou níveis proteicos aumentados para NFkB e TLR4, principalmente para astrócitos de Bergmann e células de Purkinje. A cafeína reduziu a expressão dessas moléculas para níveis comparáveis ao do grupo Controle. O receptor A2a mostrou-se superexpresso para o grupo UChB, sendo mais evidente nas células da glia. Para o receptor A1, houve maior expressão gênica no grupo UChB, mas seus níveis proteicos foram encontrados diminuídos para esse mesmo grupo, contribuindo para a hipótese de tentativa de recuperação dos níveis desse receptor através do aumento da expressão gênica. Concluiu-se que tanto o consumo de etanol quanto de cafeína modificaram marcadores inflamatórios e receptores adenosinérgicos em níveis proteicos e moleculares, sendo expressos diferencialmente nos tipos celulares do cerebelo.

ABSTRACT

Ethanol consumption tends to increase levels of inflammatory markers in the Central Nervous System. Caffeine has an antagonistic role in non-selective adenosine receptors. It is also known that the adenosinergic pathways play a protective role in the CNS. Thus, it is assumed that the consumption of caffeine is able to interfere in the cellular processes inherent to the inflammatory mechanisms, and may attenuate the installation of neuroinflammation. The objective of the present work was to recognize the alterations in the expression of genes and proteins related to the inflammatory processes and adenosinergic system in the cerebellum from the consumption of ethanol and caffeine and to detect differentially the expression of the chosen markers in the different layers of cerebellar tissue. UChB and Wistar rats, males at 5 months of age, were divided into the following groups (n = 15/group): 1. UChB (UChB rats receiving 10% ethanol solution and water ad libitum); 2. UChB + caffeine (UChB rats receiving 10% ethanol solution + 3g / L caffeine and water ad libitum); 3. Control (Wistar rats receiving water ad libitum). The cerebellar tissue was collected and processed for the RT-PCR, Western Blotting and immunohistochemistry techniques for the inflammatory markers NFκB, TLR4, TLR2 and MyD88 and adenosinergic receptors A1 and A2a. The UChB group showed increased protein levels for NFκB and TLR4, mainly for Bergmann astrocytes and Purkinje cells. Caffeine reduced the expression of these molecules to levels comparable to that of the Control group. The A2a receptor was overexpressed for the UChB group, being more evident in the glial cells. For the A1 receptor, there was more gene expression in the UChB group, but their protein levels were found decreased for this same group, contributing to the hypothesis of an attempt to recover the levels of this receptor through the increase of the gene expression. In conclusion both ethanol and caffeine consumption modified inflammatory markers and adenosinergic receptors at protein and molecular levels, being differentially expressed in cerebellar cell types.

5.1. INTRODUÇÃO

A ingestão de bebidas alcoólicas pelos seres humanos é um hábito antigo que correlaciona razões comportamentais e rituais em diversas sociedades (POLI et al., 2013). O consumo de etanol aumentou nos últimos anos a partir de fenômenos de socialização e através da divulgação publicitária (GONZALEZ-MENENDEZ, 2016). Consumir etanol de forma indiscriminada é um dos principais fatores de riscos à saúde, sendo tal substância responsável por 5,9% do total de mortes no mundo, 7,6% para homens e 4,0% para mulheres, a cada ano. As principais causas de mortes associadas ao consumo de etanol incluem doenças cardiovasculares e diabetes (33.4%), doenças gastrintestinais (16.2%) e cânceres (12.5%). Somam-se ainda as desordens neuropsiquiátricas, uma vez que o etanol é uma substância psicoativa capaz de gerar dependência (OMS, 2018).

Os efeitos de recompensa, prazer e estimulação gerados pelo consumo de etanol são mediados pela liberação de dopamina no sistema mesolímbico dopaminérgico, o qual projeta para as áreas corticais orbitofrontal e pré-frontal, responsáveis por regular o controle motivacional e cognitivo do indivíduo (NORONHA et al.; 2014). O etanol afeta também os sistemas de neurotransmissores envolvendo o ácido γ -aminobutírico, opióides endógenos, glutamato, canabinóides, noraepinefrina, serotonina (KRANZLER; SOYKA; 2018), bem como sistemas neuroendócrinos, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HILLEMACHER; LEGGIO; HEBERLEIN; 2015). Existe amplo respaldo na literatura no que se refere aos efeitos centrais dessa substância como estando primariamente relacionada à ação dos receptores GABA_A, receptores de glutamato NMDA e envolvendo também o sistema adenosinérgico (NORONHA et al.; 2014). Por meio dessas interações moleculares, o etanol é capaz de alterar o equilíbrio do microambiente interno do SNC e levar a processos como a neurodegeneração e a neuroadaptação, afetando o encéfalo como um todo (PEANA et al., 2016).

O cerebelo humano, além do seu clássico papel como mantenedor da postura e centro do controle e da função motora, é tido como órgão participante de processos homeostáticos, endócrinos, visceromotores, e ainda relacionados à cognição, memória, aprendizado, recompensa e emoções (VOZEH, 2016; WAGNER et al., 2017). Sendo as funções dos neurônios cerebelares rigidamente controladas por inputs inibitórios GABAérgicos providos pelos interneurônios localizados nas camadas granular e molecular (LUO, 2015), a ação central do etanol a partir dos

receptores GABA_A elucidada o envolvimento do cerebelo nas diversas alterações resultantes da exposição a essa droga, sendo afetadas as diversas camadas celulares que compõem a circuitaria cerebelar (PEANA et al., 2016) e que são basicamente três, quando observa-se o córtex cerebelar: a camada molecular, mais superficial, seguida pela camada de células de Purkinje e pela camada granular, mais profunda (VOZEH, 2016).

Isto posto, o cerebelo como órgão-alvo do etanol se torna evidente quando considerado aspectos clínicos de pacientes expostos à droga. É conhecido que, crianças quando expostas no período pré-natal, ao etanol apresentam sintomas associados a déficit cerebelar, além da redução do volume cerebelar, em especial, do tamanho do vérmis (AUTTI-RÄMÖ et al., 2002). Em alcoólicos crônicos, distúrbios da marcha e ataxia dos membros são sintomas clínicos de disfunção cerebelar evidente (JAATINEN; RINTALA, 2008; LUO, 2015).

Quanto ao efeito direto do etanol nas camadas que compõem o córtex cerebelar, tem sido relatada a susceptibilidade dos neurônios de Purkinje, Golgi e Granulares a variações agudas e crônicas nos níveis sanguíneos de etanol, em diferentes idades (GHIMIRE et al., 2009; BAGHERI et al., 2015). Modificações na estrutura celular foram observadas após consumo crônico de etanol em ratos, resultando na dilatação do retículo endoplasmático liso nos neurônios de Purkinje, processo acompanhado por morte neuronal ou apoptose axonal (DLUGOS, 2015). O cerebelo de ratos adultos UChA apresentou neurônios granulares e de Purkinje com núcleos apoptóticos, citoplasma com acúmulo de gotas lipídicas e desorganização da substância branca (OLIVEIRA et al., 2014). Martinez et al. (2015) relataram o corpo medular do cerebelo de ratos UChA adultos com número significativo de células apoptóticas, aumento nos espaços interaxonais e deterioração da bainha de mielina com desestruturação de sua forma característica. Martinez et al. (2018) verificaram que o etanol foi capaz levar a neurodegeneração em células da glia e neurônios cerebelares em ratos UChB.

Além das modificações estruturais, a ingestão de etanol aumenta os níveis cerebrais de moléculas reconhecidamente envolvidas com a resposta imune, evidenciando a instalação de processo neuroinflamatório. Evidências que indicam que o consumo crônico de etanol aumenta o nível de citocinas no SNC (CREWS et al., 2006). Em ratos submetidos ao consumo crônico de etanol foi verificado aumento da expressão de iNOS, COX-2 e IL-1b, além do aumento de três das maiores famílias de quinases estressoras existentes (ERK 1/2, p38 and JNK) (VALLES et al., 2004). A micróglia, célula responsável pela resposta imune inata dentro do SNC, e os neurônios, respondem

sinalizando através da estimulação de receptores do tipo Toll (TLR's), que ativam, direta ou indiretamente, a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NFkB), microRNAs e citocinas pró-inflamatórias (CREWS et al., 2017; VETRENO et al., 2018). A ativação do NFkB estimula a transcrição do fator de necrose tumoral, TNF- α , cuja ação pode levar a apoptose ou necroptose (BORGHI; VERSTREPEN; BEYAERT, 2016).

A cafeína, uma xantina alcaloide, é uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo (FREDHOLM; YANG; WANG, 2016). É encontrada em uma ampla variedade de alimentos e bebidas, como refrigerantes, chocolates, cafés e chás, sendo consumida, principalmente, por suas propriedades estimulantes (DOEPKER et al., 2016). Tal efeito deve-se ao seu papel antagonístico não-seletivo dos receptores adenosinérgicos A1, A2a, A2b e A3, tendo maior destaque a participação dos dois primeiros. Assim, tais receptores participam da composição do sistema adenosinérgico, presente em diversos tecidos e inclusive no encéfalo humano, onde é reconhecido como um modulador da neurotransmissão e da resposta inflamatória (WARDAS, 2002).

A quebra da adenosina trifosfato (ATP) pelas atividades do organismo durante o dia aumenta a quantidade de adenosina livre no SNC, que, por sua vez, se liga aos receptores A1 e A2a. Essa ligação diminui a atividade neural e promove o estado de sonolência e sensação de cansaço. A conformação da cafeína permite a sua ligação a esses receptores sem diminuir, no entanto, a atividade neural, pois a sua estrutura apesar de semelhante à da adenosina, não ativa as mesmas cascatas de sinalização para a diminuição do desempenho cerebral. Dessa maneira, a cafeína age como estimulante do SNC através da inibição por competição dos efeitos da adenosina (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004; PELELI et al., 2017).

Sabe-se que a via adenosinérgica desempenha um papel protetor importante no SNC (WARDAS, 2002), então, supõe-se que o consumo de cafeína seja capaz de interferir justamente nos processos celulares inerentes aos mecanismos inflamatórios, podendo prevenir, retardar ou até mesmo atenuar a instalação da neuroinflamação e, indiretamente, da neurodegeneração (HEIMFARTH et al., 2013). Por atuar através do sistema adenosinérgico, a cafeína tem potenciais efeitos sobre a modulação dos processos inflamatórios a partir de sua influência sobre os receptores A2a, presente em células imunes. Apesar da relação entre as vias da inflamação e as vias adenosinérgicas ainda não serem completamente estabelecidas, Tsuitsui et al. (2004) notaram que o aumento de receptores adenosinérgicos A1 atenuou a desmielinização e neuroinflamação em

modelos de esclerose múltipla. Madeira et al. (2016) mostraram que houve diminuição da inflamação da retina de modelos animais para glaucoma nos grupos que ingeriram cafeína. Estudos sugerem que a ativação dos receptores A2a resulta em fenótipos reativos de micróglia, levando a aumento de fatores neurotóxicos e de elementos não celulares que culminam no estabelecimento da neuroinflamação (BOIA; AMBROSIO; SANTIAGO, 2016). Reforçando a hipótese da cafeína como neuroprotetora, estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de cafeína está inversamente relacionado ao surgimento de disfunções neurológicas como Alzheimer e Parkinson, cujo eixo de patogênese é a neuroinflamação crônica (BROTHERS; MARCHALANT; WENK, 2010).

Também o consumo de etanol parece ter notáveis efeitos sobre o sistema adenosinérgico e as suas inter-relações começam a ser exploradas à luz da literatura atual. A exposição aguda ao etanol aumentou os níveis extracelulares de adenosina, pressupondo a sua mediação nos efeitos atáxicos, sedativos e hipnóticos do etanol, enquanto a exposição crônica ao álcool levou a uma diminuição da expressão e sinalização adenosinérgica. Além do mais, a modulação desregulada da transmissão glutamatérgica pela adenosina na região estriatal tem implicado fortemente num potencial abuso de etanol pelo indivíduo (RUBY et al., 2014). Butler & Prendergast (2012) apontaram para alterações na sinalização adenosinérgica na interface de diversos efeitos trazidos pela exposição aguda ao etanol, particularmente no que se refere à sedação e função motora. Ainda, a exposição crônica ao etanol mostrou adaptações na superfície celular quanto à expressão e função tanto de receptores A1 quanto de A2a. Kuo et al. (1979) descreveram diminuição do modulador inibidor da adenosina no cerebelo de camundongos após ingestão de etanol, cafeína e fenobarbital. Parkinson et al. (2009) analisaram as expressões gênicas dos receptores de adenosina e enzimas metabolizadoras de purina em camundongos transgênicos consumidores de etanol e cafeína.

No estudo de Martinez et al. (2018) a análise da ação do consumo concomitante de etanol e cafeína no cerebelo de ratos UChB mostrou relevante capacidade da cafeína em reverter os danos apoptóticos causados pelo etanol nas células Granulares, de Golgi e ainda nas células da Glia do cerebelo, suprimindo em grande parte a expressão de Caspase-3 e intensificando a expressão de XIAP. No entanto, pouco ainda se sabe sobre como a cafeína é capaz de agir para a atenuação da perda neuronal. Acredita-se que dentre as formas de retardo dos processos neurodegenerativos, uma das formas, além da diminuição da taxa de apoptose, seja, primeiramente, pelo combate à neuroinflamação (ULLAH et al., 2015; MADEIRA et al., 2016).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi identificar as alterações das expressões de genes e proteínas relacionados aos processos inflamatórios e sistema adenosinérgico no cerebelo a partir do consumo de etanol e da interação entre etanol e cafeína. Objetivou-se detectar diferencialmente a expressão dos marcadores NFkB, TLR4, MyD88, TLR2, A1 e A2a nas diferentes camadas do tecido cerebelar.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Procedimentos experimentais

No presente trabalho, foi utilizado um total de 30 ratos adultos da variedade UChB, do sexo masculino, com cinco meses de idade e 15 ratos Wistar, também do sexo masculino, com cinco meses de idade. Durante o estudo, os animais receberam dieta sólida (ração Purina) e água "ad libitum", sendo alojados em caixas individuais com fundo sólido e forradas com maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de luz e 12h de escuro) e temperatura (20 à 25°C). Os animais foram divididos em três grupos experimentais (N=15): (1º: grupo UChB) - grupo de ratos UChB de consumo voluntário de etanol a 10% (água + etanol, sendo que cada animal consumiu 7g de etanol/kg de peso corpóreo/dia), (2º: grupo UChB+cafeína) - grupo de ratos UChB de consumo voluntário de etanol a 10% (água + etanol, sendo que cada animal consumiu 7g de etanol/kg de peso corpóreo/dia + 3g de cafeína a cada litro de solução consumida) e (3º: grupo Controle) - grupo de ratos Wistar com o consumo de água "*ad libitum*".

A Seleção dos animais bebedores de etanol e padronização da variedade UChB foi realizada de acordo com o protocolo de Mardones e Segovia-Riquelme (1983). Do fim do período da seleção até a eutanásia (80 aos 150 dias de idade), o consumo de etanol foi medido a cada 7 dias. Os ratos do grupo UChB+cafeína permaneceram 55 dias consecutivos (95 aos 150 dias) ingerindo voluntariamente a solução de etanol a 10% adicionada de cafeína.

O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unicamp sob o protocolo de número 4651-1/2017 e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSCar sob o protocolo de número 9895280815. Após o período de experimentação, a eutanásia dos animais foi realizada por sobredosagem de anestesia (Xilazina 300 mg/kg e Cetamina 40 mg/kg, via intraperitoneal). Amostras do cerebelo de 5 animais

foram destinadas para as análises moleculares, 5 amostras foram destinadas às técnicas de imunohistoquímica e outras 5 amostras teciduais foram destinadas à técnica de Western blotting.

5.2.2. Expressões gênicas de NFkB, MyD88, TLR4, TLR2, A1, A2a no tecido cerebelar

Amostra do cerebelo de cinco animais por grupo foi congelada e adicionada de 250µl de PBS e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). O fragmento de tecido cerebelar foi homogeneizado com a utilização de um aparelho Politron®. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, acrescentou-se 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada por 15 minutos a 4°C e 13.200 rpm e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 4°C e 13.200 rpm, desprezou-se o sobrenadante. A seguir, acrescentou-se 1000µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 5 minutos a 13.200 rpm. A fase superior foi desprezada e o pellet seco dissolvido com água tratada com DEPC por 15 minutos. Esse material, em seguida, foi aliquoteado, identificado e armazenado a -80°C. Cada amostra, ao final da etapa descrita acima, foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA para verificação da integridade do RNA obtido. Para a síntese do cDNA (DNA complementar) a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, de acordo com as instruções do fabricante para a síntese do cDNA (DNA complementar). Para cada 1µg de RNA, foi adicionado 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0µl de dNTP's; 2,5µl de Random Primers e 1,25µl da enzima MultiScribe™, completando com água DEPC o volume final de 20µl.

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial de alguns genes relacionados as vias inflamatórias e adenosinérgicas. Realizou-se a quantificação relativa dos genes NFkB (Assay ID Rn00595794_m1), TLR4 (Assay ID Rn00569848_m1), A1 (Assay ID Rn00567668_m1), A2a (Assay ID Rn00583935_m1), MYD88 (Assay ID Rn01640049_m1) e TLR2 (Assay ID Rn02133647_s1) e utilizou-se como normatizador o gene β -actina. A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RT-PCR), com a utilização da TaqMan Master Mix (Applied Biosystems). Para a análise quantitativa da expressão dos genes supracitados, foram

utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay-on-demand, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems). Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) foi utilizado juntamente com o software Sequence Detection System para a obtenção dos valores de CT. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi realizada em um volume final de 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico TaqMan Master Mix, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA diluído 1:10. Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de Δ CT. As condições padrão para amplificação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão, simultâneos).

5.2.3. Extração de Proteínas e Western Blotting

Cinco amostras cerebelares de cada grupo foram congeladas e posteriormente homogeneizadas através do homogeneizador Polytron (Kinematica) por 1 min em 50 μ l/mg de tampão de extração RIPA contendo 10% (v/v) Triton X-100 and 10 μ l/ml de cocktail inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA). As amostras foram misturadas (1:1) com tampão de amostra 3X (100mM Tris-HCl pH 6.8, 10% β -mercaptoetanol, 4% SDS and 20% glycerol), incubadas em banho seco a 95°C por 5 minutos. O correspondente a 50 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 120 V por 90 minutos. As membranas foram então bloqueadas com BSA 3% diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os mesmos anticorpos primários utilizados nos procedimentos de imunomarcação para os antígenos NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1 e A2a (descrição dos anticorpos no item 2.3) com diluição variando entre 1:200-1:1000. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários anti-rabbit e anti-mouse HRP conjugados na diluição de 1:2000 em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, foi acrescentado 10ml de solução quimioluminescente (Super Signal West Pico Chemiluminescent/Thermo Scientific/34080) e a atividade da peroxidase foi revelada por um sinal luminescente das bandas de Western Blotting, as

quais foram capturadas pelo equipamento G-BOX e chemicamera (Syngene, Cambridge, UK). As intensidades da marcação obtidas para as diferentes moléculas foram determinadas por densitometria através do programa de análise de imagens NIS-Elements: Advanced Research (USA). Anticorpo para β -actina foi usado como controle endógeno.

5.2.4. Imunomarcção dos antígenos NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1 e A2a

O cerebelo de cinco animais por grupo foi perfundido e fixado em solução de paraformaldeído (4%). Posteriormente, foram emblocados em parafina e foram obtidos cortes de 3 μ m de espessura através do micrótomo (Biocut – Modelo 1130), sendo coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1 e A2a foram localizados através dos anticorpos monoclonais mouse TLR4(25) (sc-53462, Santa Cruz Biotechnology) para TLR4, mouse NFkB (F6) (sc-8008, Santa Cruz Biotechnology) para NFkB, mouse 7F6-G5-A2 (sc-32261, Santa Cruz Biotechnology) para A2a, e policlonais rabbit ADORA1 (bs-4235R, Bioss) para A1, TLR2 (bs-1019R, Bioss) para TLR2, MyD88 (bs-1047R, Bioss) para MyD88. Estes foram localizados através dos anticorpos diluídos (1:35-200) em BSA 1% e armazenados overnight a 4 °C. O kit Envision HRP (Dako Cytomation Inc., EUA) foi usado para detecção dos antígenos, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do kit Envision (Dako) por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris.

5.2.5. Método de quantificação da imunohistoquímica

Para a quantificação da imunohistoquímica amostras do cerebelo de 5 animais de cada grupo experimental foram avaliadas através do precipitado acastanhado de DAB, o qual indica a imunorreatividade dos anticorpos.

Para a contagem, foram considerados os seguintes tipos celulares: Astrócitos de Bergmann, células de Purkinje, neurônios Granulares, neurônios de Golgi e células da Substância Branca (no

corpo medular do cerebelo foram contadas as células da glia, indiferenciadamente, e foram excluídos da contagem os neurônios dos núcleos cerebelares).

Para a contagem das células de Purkinje e dos Astrócitos de Bergmann, dez campos aleatórios, sem sobreposição, foram analisadas por animal, utilizando-se a objetiva de 40X. Estes campos foram fotografados em Nikon Eclipse E-400 microscópio de luz (Nikon, Tóquio, Japão). Nestas fotomicrografias, a camada de neurônios de Purkinje e os Astrócitos de Bergmann em seus arredores foi fotografada em diagonal de forma a capturar a maior extensão possível dessa camada, que possui aspecto linear, como demonstrado na Figura 10 (D e E). A extensão analisada por fotomicrografia para esses tipos celulares foi de aproximadamente 390 μm .

Para a contagem dos neurônios Granulares, neurônios de Golgi e células da Substância Branca, dez campos aleatórios, com área de aproximadamente 72000 μm^2 , equivalente a 0,072 mm^2 , contendo apenas a camada granular ou centro branco medular, como demonstrado na Figura 12 (P) e 10 (J), respectivamente, foram fotografada e o número de células reativas foi mensurado,.

A comparação entre os grupos para cada tipo celular contado foi feita nos seguintes termos: se o grupo apresentou maior número de células imunorreativas que outros, este apresentou marcação SUPERIOR ou ELEVADA em relação aos outros. Se um grupo apresentou menor número de células imunorreativas que outros, este apresentou marcação INFERIOR ou MENOR em relação aos outros. Se um grupo apresentou mesmo número de células imunorreativas que outros, estes apresentaram marcação EQUIVALENTE ou IGUAL aos outros.

Especificamente para o TLR2, a marcação citoplasmática foi dispersa impossibilitando a mesma padronização morfométrica. Dessa forma, a avaliação da imunomarcação foi feita de forma qualitativa, por observação dos dez campos aleatórios fotografados pela objetiva de 40X. Quanto mais intensa e frequente a coloração pelo DAB, maior foi considerada a marcação.

5.2.6. Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram exportados para Excel e transferidos para o software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA), utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística. Todos os valores obtidos para cada técnica foram considerados paramétricos dentro do grupo analisado através do teste de distribuição normal Shapiro-Wilk. Para as análises de significância estatística entre os grupos, foi utilizado o teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Foram considerados diferentes entre si os valores que tiveram $p < 0,05$.

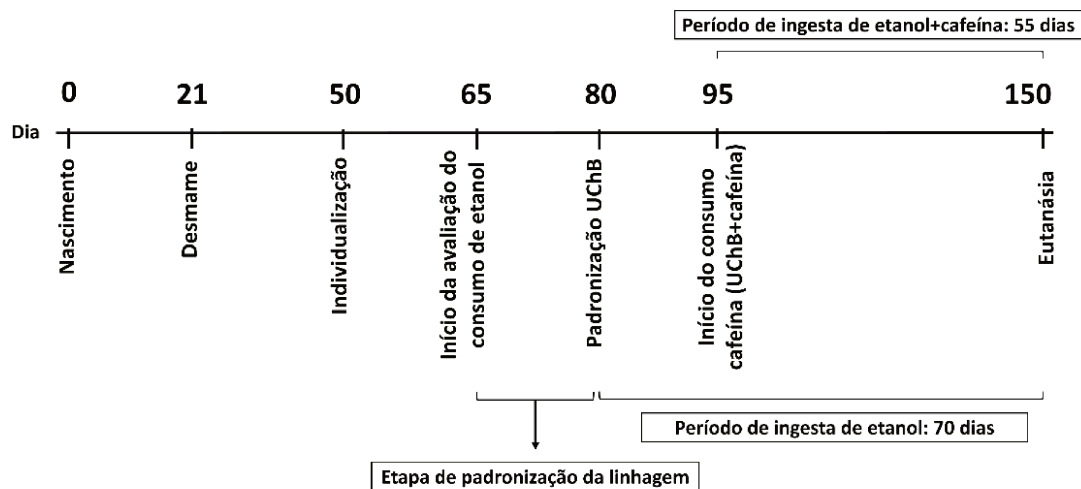


Figura 1. Desenho experimental para os grupos UChB e UChB+cafeína a partir do nascimento dos animais e da padronização da linhagem. Modificado de Martinez et al. (2018).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Expressão gênica dos marcadores inflamatórios e receptores adenosinérgicos no tecido cerebelar

Para a expressão gênica dos marcadores NFkB e TLR4 não foi verificada modificação após o consumo de etanol ou cafeína nos grupos UChB e UChB+cafeína. Para o TLR2, ocorreu diminuição da expressão gênica após o consumo de etanol isolado ou adicionado à cafeína. A expressão gênica do MyD88 apresentou diferença estatística entre os grupos UChB (aumentada) e UChB+cafeína (diminuída), porém, os mesmos grupos não diferiram significativamente do grupo Controle (Fig. 2).

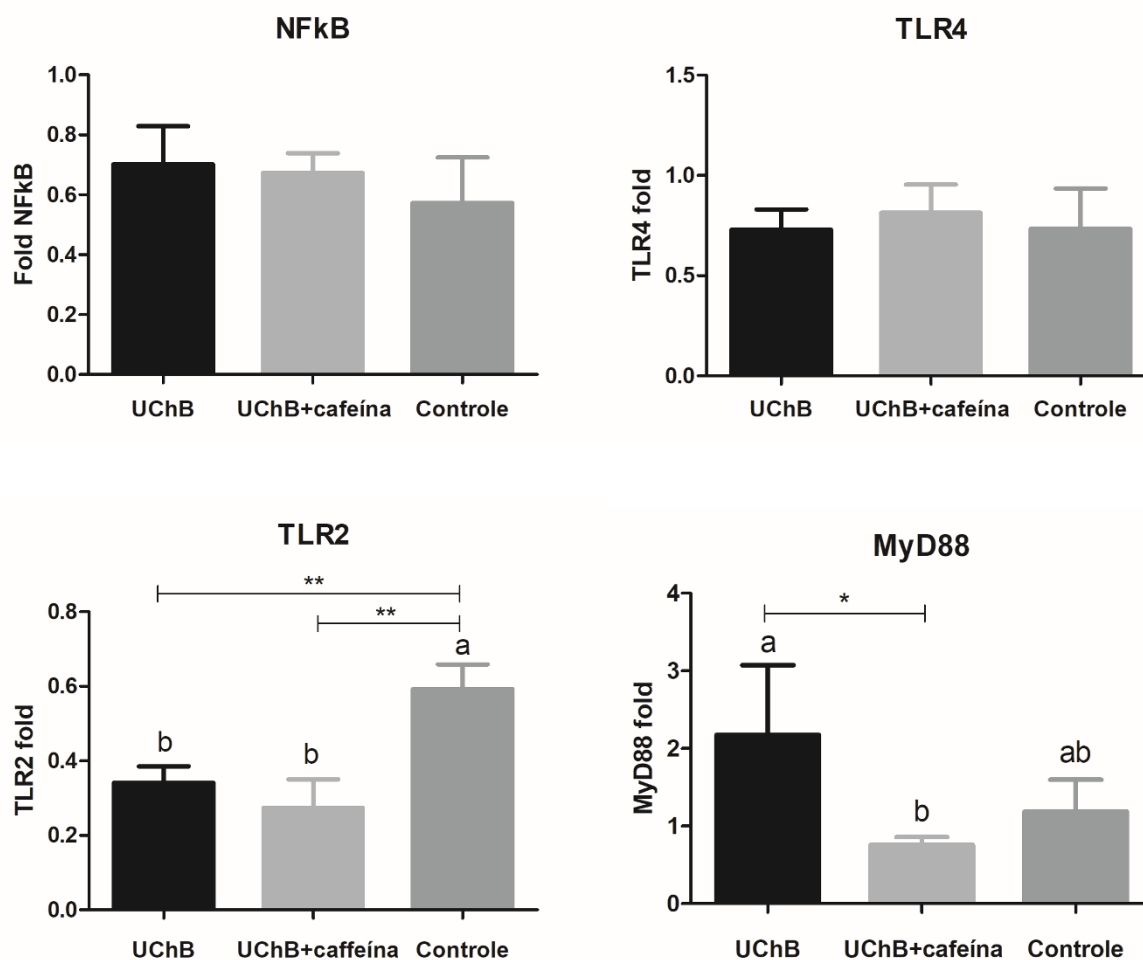


Figura 2. Análises das expressões gênicas dos marcadores inflamatórios NFkB, TLR4, TLR2 e MyD88 no tecido cerebelar. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Para os receptores adenosinérgicos, aumento da expressão gênica tanto do A1 quanto A2a foi verificado para o grupo UChB. O consumo de cafeína foi capaz de reduzir esse aumento para o grupo UChB+cafeína, equiparando as expressões de ambos os receptores à expressão encontrada para o grupo Controle (Fig. 3).

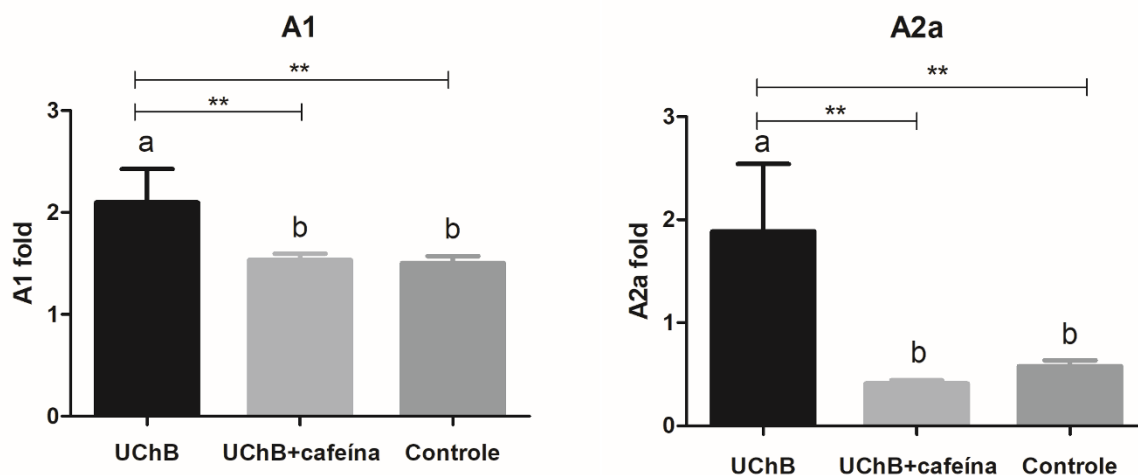


Figura 3. Análises das expressões gênicas dos receptores adenosinérgicos A1 e A2a no tecido cerebelar. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. *p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001.

5.3.2. Níveis proteicos dos receptores adenosinérgicos e marcadores inflamatórios no tecido cerebelar

O nível proteico dos receptores adenosinérgicos variou significativamente após a ingestão de etanol ou de cafeína adicionada ao etanol. Diferentemente do que houve para a expressão gênica, redução do receptor A1 foi encontrada para o grupo UChB. Os níveis de A1 aumentaram para os grupos Controle e UChB+cafeína.

Para o A2a, aumento desse receptor para o grupo UChB foi identificado. Os níveis de A2a diminuíram para os grupos Controle e UChB+cafeína (Fig.4).

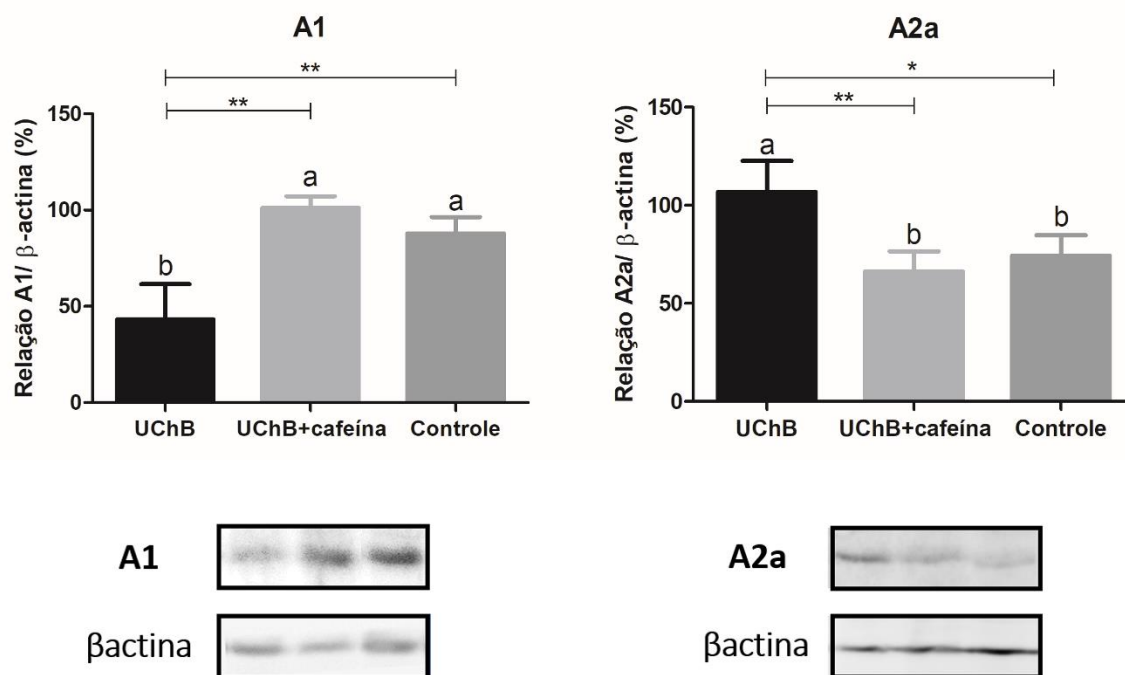


Figura 4. Análises do nível proteico dos receptores adenosinérgicos A1 e A2a no tecido cerebelar. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A expressão dos marcadores inflamatórios NF κ B, TLR4 e TLR2 aumentou para o grupo UChB quando comparada aos grupos UChB+cafeína e Controle. Entre o grupo Controle e UChB+cafeína diferenças significativas para esses marcadores não foram observadas.

Para o TLR2, aumento significativo para o grupo UChB foi verificado em relação aos grupos Controle e ao UChB+cafeína. Para o MyD88, diminuição da expressão foi identificada após o consumo concomitante de etanol e cafeína (Fig. 5).

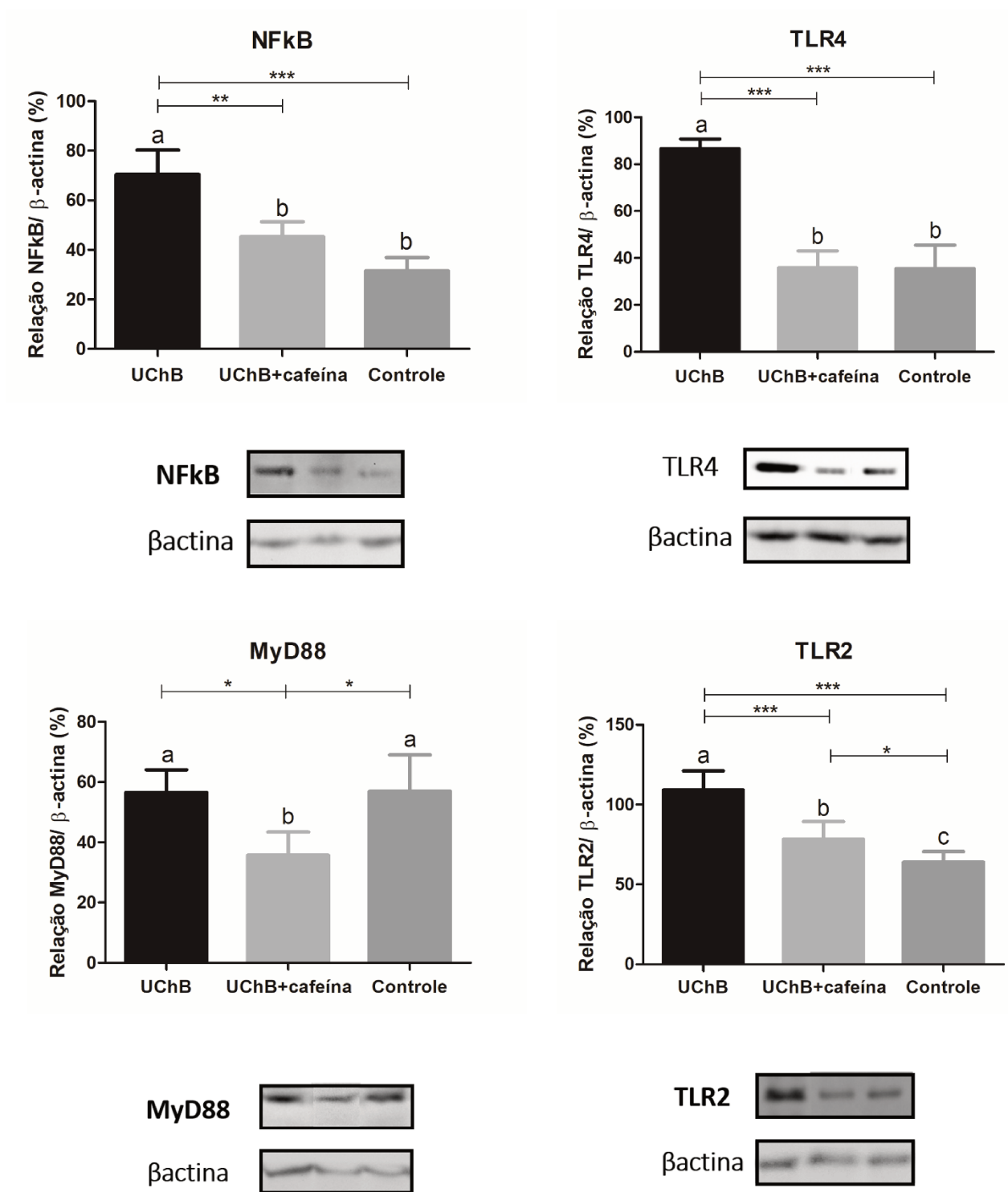


Figura 5. Análises do nível proteico dos marcadores inflamatórios NFκB, TLR4, TLR2 e MyD88 no tecido cerebelar. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.3.3. Etanol e cafeína alteraram diferencialmente a expressão dos marcadores inflamatórios para os tipos celulares analisados.

Os resultados mostraram evidentemente que para o marcador TLR4 houve imunomarcacão baixa para o grupo UChB+cafeína em todos os grupos celulares analisados (Fig.6).

Para os Astrócitos de Bergmann, a imunomarcacão entre o grupo UChB e Controle foi semelhante, porém no grupo UChB+cafeína esta molécula foi significativamente reduzida em relação aos grupos UChB e Controle. Os neurônios de Golgi apresentaram resposta tecidual semelhante aos Astrócitos de Bergmann.

Para as células de Purkinje, variação na imunolocalização foi identificada entre os três grupos analisados. No grupo UChB, positividade superior foi identificada para o antígeno quando comparado aos grupos Controle e ao UChB+cafeína. Os neurônios Granulares tiveram resposta tecidual semelhante às células de Purkinje.

Para as células da Substância Branca, imunomarcacão elevada do TLR4 foi caracterizada para o grupo Controle em relação aos grupos UChB e UChB+cafeína. O grupo UChB+cafeína apresentou imunomarcacão inferior quando comparada ao obtido no grupo UChB.

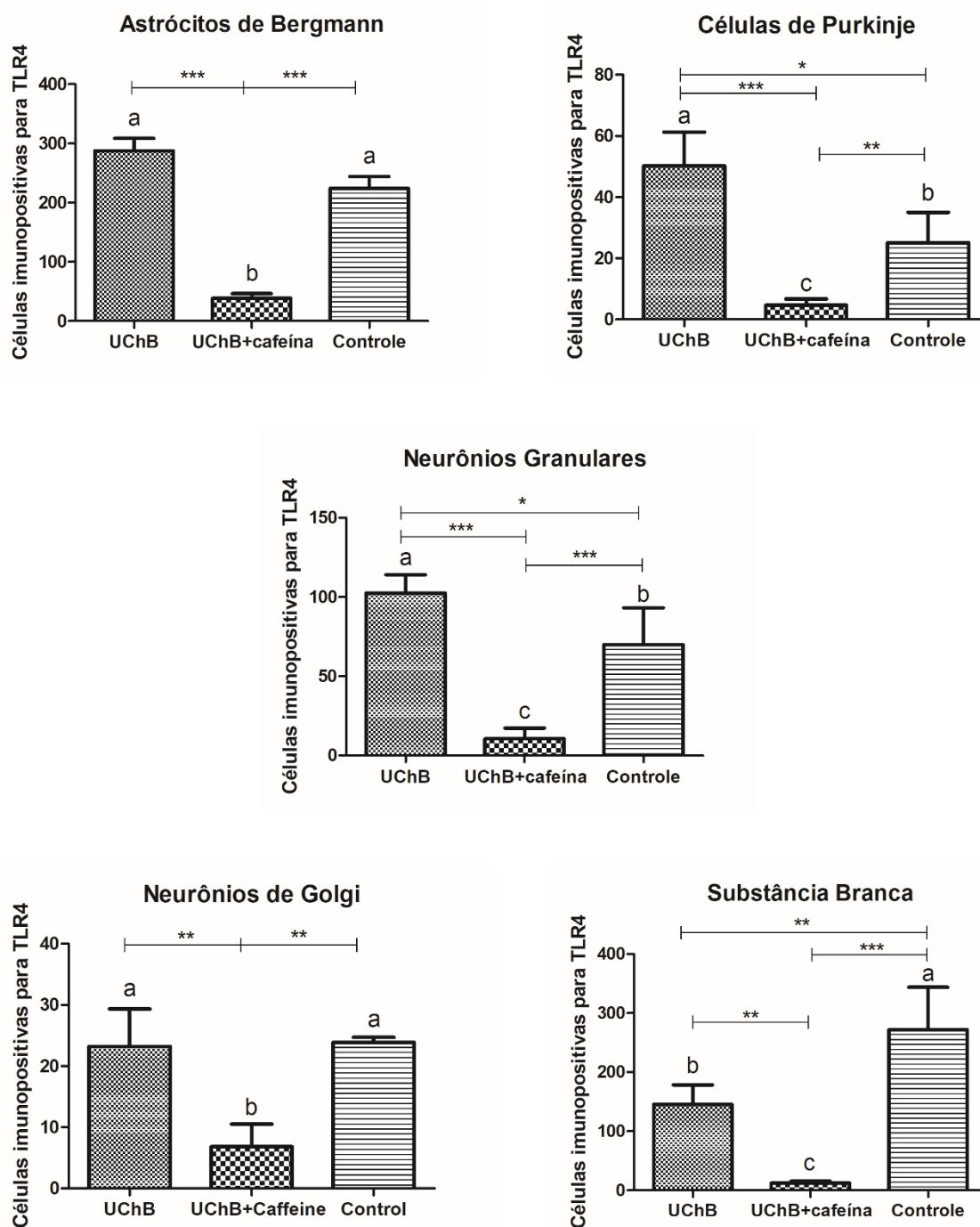


Figura 6. Análises do número de células imunopositivas do marcador inflamatório TLR4 para diferentes tipos celulares no tecido cerebral. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

O marcador NFkB apresentou mais variação de expressão entre os tipos celulares analisados do que o antígeno TLR4 (Fig.7).

Para os astrócitos de Bergmann, elevada frequência de células marcadas foi identificado para grupo UChB em relação aos grupos Controle e UChB+caféina.

Para as células de Purkinje, o consumo de etanol levou a imunomarcção superior para os grupos UChB e UChB+caféina em comparação ao grupo Controle. Ressalta-se que a comparação entre os grupos UChB e UChB+caféina mostrou que a caféina apresentou tendência numérica de diminuição da positividade para o NFkB.

Os neurônios granulares apresentaram elevada imunomarcção no grupo Controle, já para o grupo UChB, a imunomarcção diminuiu, sendo essa ainda menor no grupo UChB+caféina.

Para os neurônios de Golgi, observou-se que o consumo de etanol elevou a imunomarcção nos grupos UChB e UChB+caféina, não tendo a caféina, para o NFkB, nenhum efeito aparente sobre esse tipo celular.

Para as células da Substância Branca, significativa diminuição de marcação foi verificada para o grupo UChB+caféina e equivalência entre os grupos UChB e Controle.

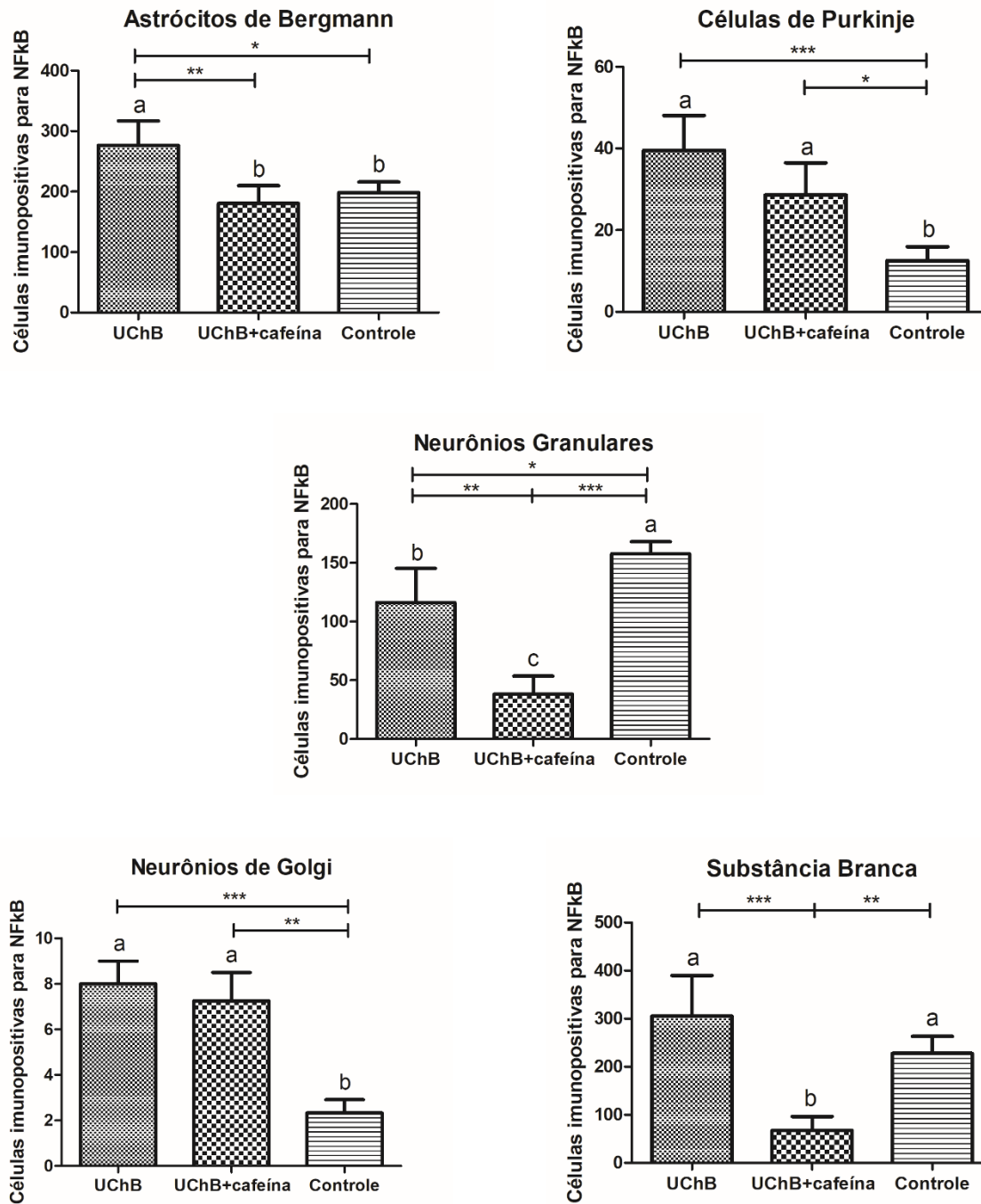


Figura 7. Análises do número de células imunopositivas do marcador inflamatório NFκB para diferentes tipos celulares no tecido cerebelar. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

O marcador MyD88 apresentou tendência de elevada expressão nos grupos UChB e Controle (Fig.8).

Para os Astrócitos de Bergmann, os níveis de imunomarcção entre os grupos UChB e Controle foram iguais estatisticamente e o grupo UChB+caféina apresentou marcação inferior para esse tipo celular.

Para as células de Purkinje, elevada imunopositividade desse tipo neuronal foi verificada para o grupo Controle, tendo o consumo de etanol diminuído a imunorreatividade para os grupos UChB e UChB+caféina.

Para os neurônios Granulares e de Golgi ocorreu resposta tecidual semelhante entre esses tipos celulares, com elevada imunomarcção de MyD88 para o grupo UChB em relação aos grupos Controle e ao grupo UChB+caféina. Na comparação entre estes dois últimos grupos, a caféina diminuiu os níveis de imunorreatividade para o antígeno.

Para as células da Substância Branca, marcação com elevada frequência foi identificada para o grupo UChB em relação aos grupos UChB+caféina e Controle.

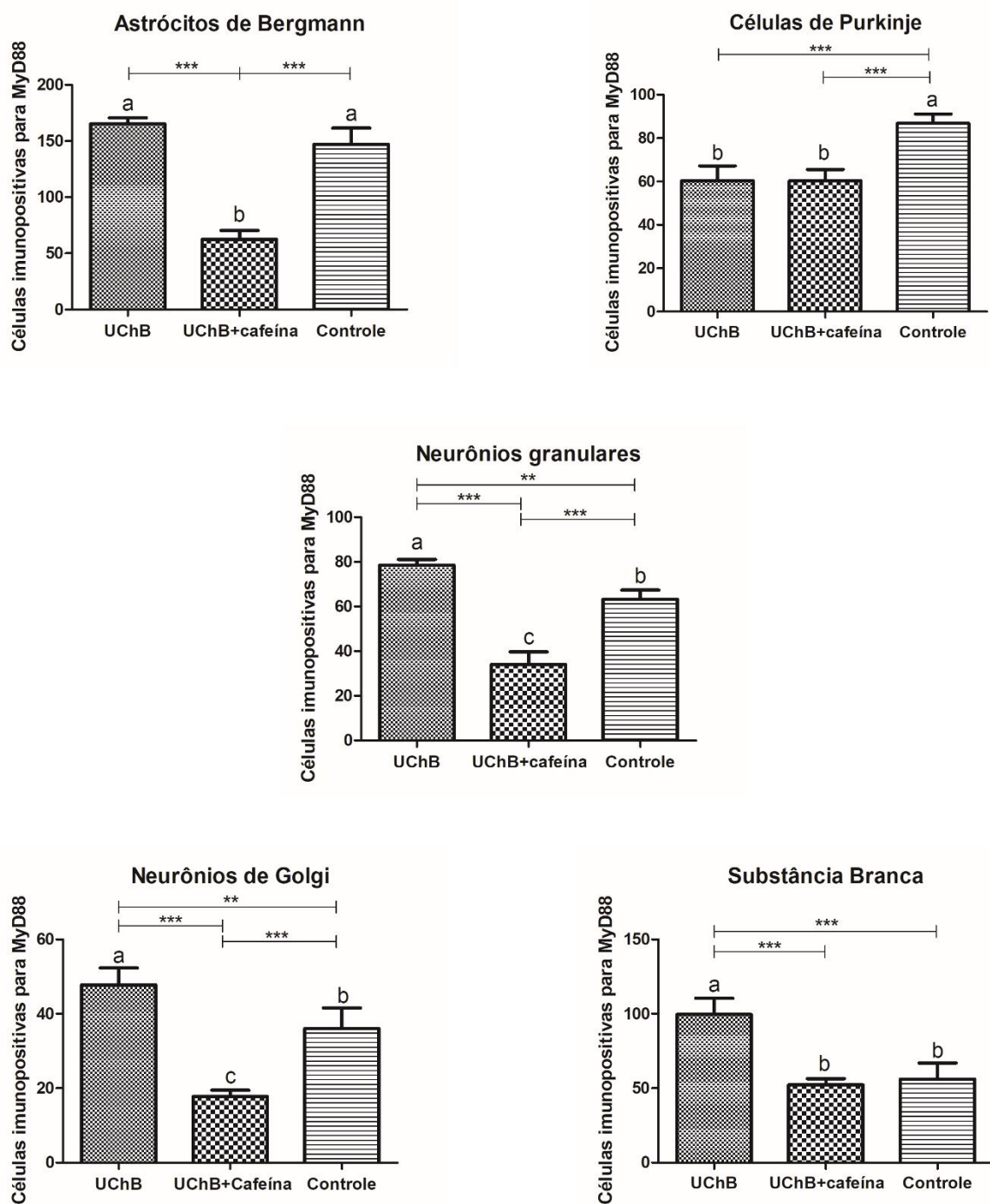


Figura 8. Análises do número de células imunopositivas do marcador inflamatório MyD88 para diferentes tipos celulares no tecido cerebelar. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

O TLR2 apresentou elevada imunoreatividade qualitativamente para os grupos UChB e Controle. O grupo UChB+caféina apresentou diminuída imunoreatividade para esse antígeno (Fig. 9).

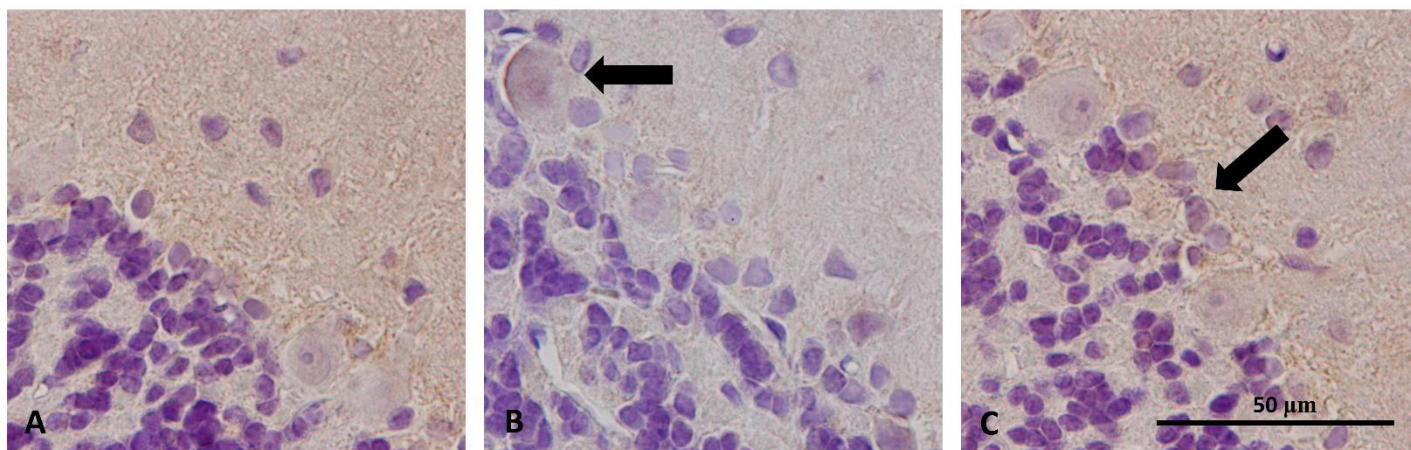


Figura 9. Imunohistoquímica para o antígeno TLR2. **A.** Imunomarcção para a camada molecular, granular e de Purkinje do cerebelo do grupo UChB. Notou-se expressão moderada e dispersa ao redor dos Astrócitos de Bergmann e na camada molecular (100x). **B.** Imunomarcção para a célula de Purkinje no grupo UChB+caféina (seta). Notou-se marcação menos presente do que para o grupo UChB (100x). **C.** Imunomarcção para o grupo Controle, semelhante ao grupo UChB, dispersa ao redor dos Astrócitos de Bergmann (seta). A escala mostrada no canto inferior direito da figura C é comum para A e B.

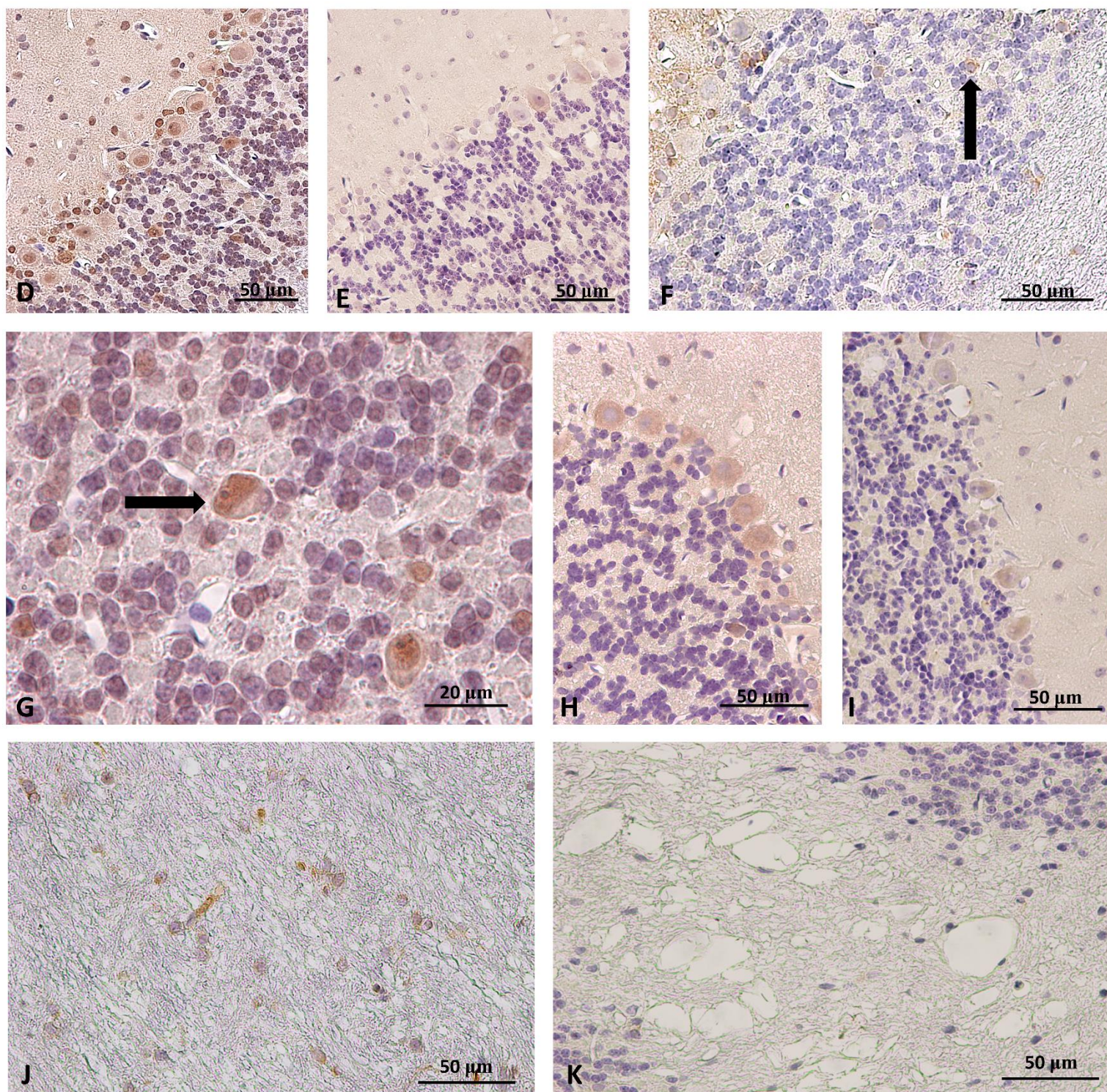


Figura 10. Imunohistoquímica dos marcadores inflamatórios TLR4, NFkB e MyD88 no cerebelo dos grupos UChB, UChB+caféina e Controle. **D.** Imunomarcção para TLR4 no grupo UChB. Notou-se marcação muito frequente para Astrócitos de Bergmann e neurônios de Purkinje (40x). **E.** Imunomarcção para TLR4 no grupo UChB+caféina. Notou-se marcação menos frequente para as células de Purkinje e Astrócitos de Bergmann (40x). **F.** Imunomarcção para NFkB nos neurônios da camada granular para o grupo Controle (40x). **G.** Imunomarcção para TLR4 na camada granular do grupo UChB. Destaque para os neurônios de Golgi positivos para o antígeno (100x). **H.** Imunomarcção para MyD88 no cerebelo do grupo Controle. Notou-se frequente positividade para as células de Purkinje (40x). **I.** Imunomarcção para MyD88 no cerebelo do grupo UChB+caféina (40x). **J.** Imunomarcção para NFkB nas células do corpo medular do cerebelo do grupo UChB. Notou-se frequente reatividade para esse antígeno (40x). **K.** Imunomarcção para NFkB nas células do corpo medular do cerebelo do grupo UChB+caféina. Notou-se baixa reatividade para esse antígeno (40x). Escala mostrada no canto inferior direito de cada fotomicrografia.

5.3.4. Etanol e cafeína alteraram diferencialmente a expressão dos receptores adenosinérgicos para os tipos celulares analisados

Para o receptor de adenosina A2a, pôde ser notada baixa imunorreatividade para esse antígeno em todas as camadas do córtex cerebelar, com exceção das células da substância branca do cerebelo (Fig.11 e 12). Dessa forma, elevado número de células positivas para o centro branco medular foi observada nos animais do grupo UChB e imunomarcção inferior foi observada para os animais do grupo UChB+cafeína, comparáveis aos níveis obtidos para o grupo Controle.

Eventualmente, células positivas para o A2a na camada granular do cerebelo foram observadas (Fig.12-P).

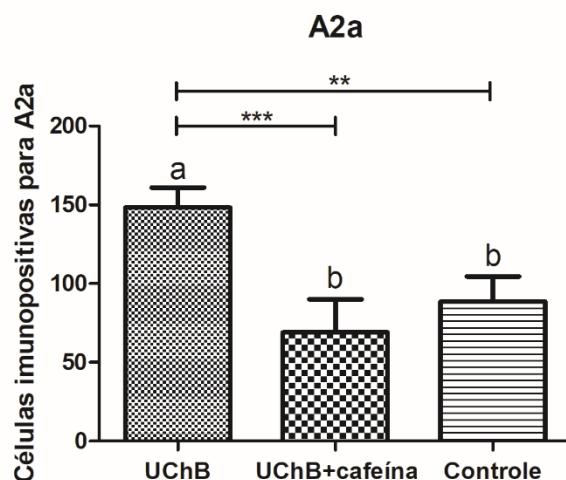


Figura 11. Análises do número de células imunopositivas para o receptor de adenosina A2a para as células da glia do corpo medular do cerebelar. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. *p <0,05, **p<0,01, *** p <0,001.

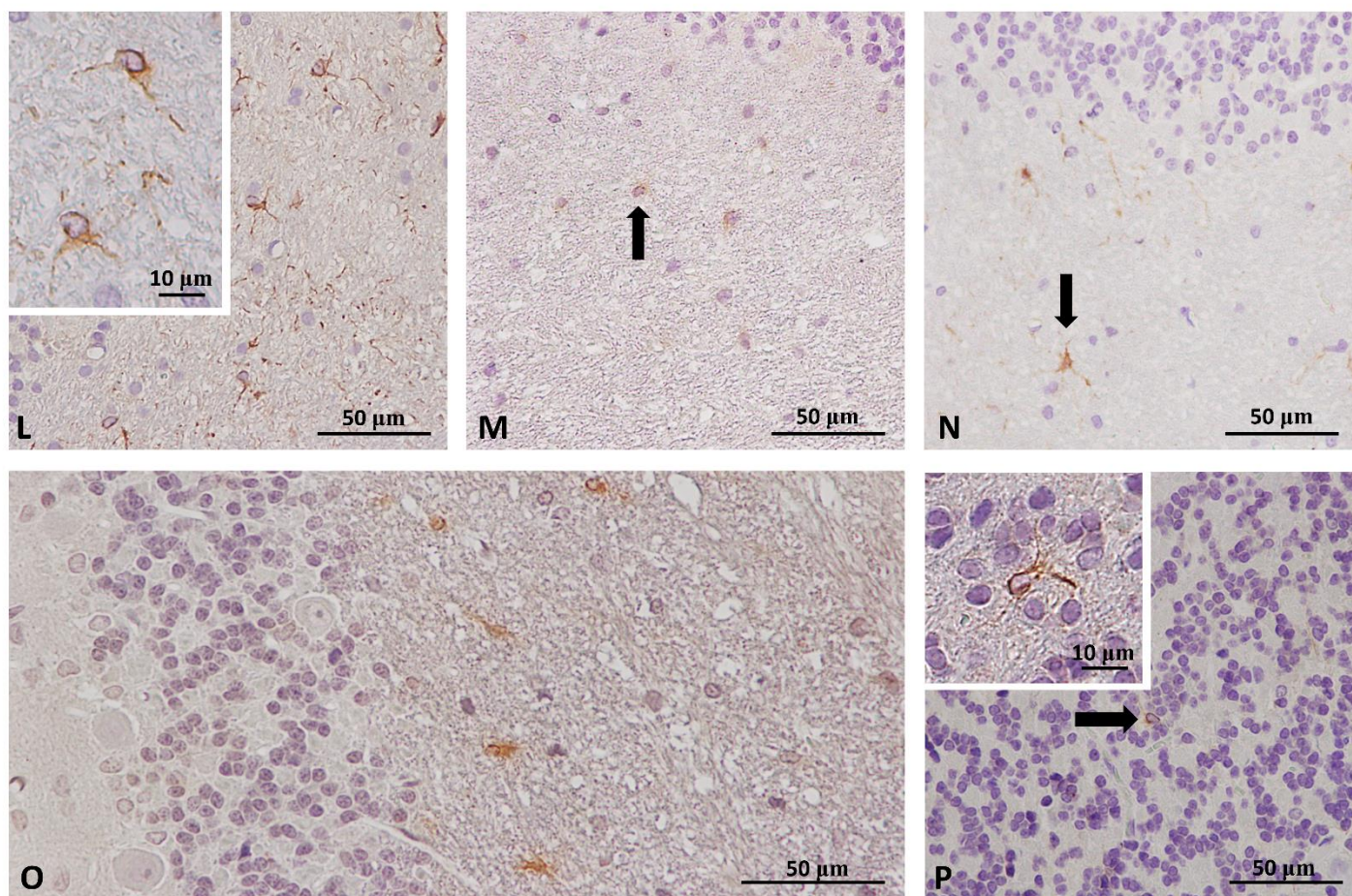


Figura 12. Imunomarcção do receptor adenosinérgico A2a no tecido cerebelar dos grupos analisados. **L.** Imunomarcção expressiva para o grupo UChB em células imunes do corpo medular do cerebelo do grupo UChB (40x). Em detalhe, notou-se a marcação citoplasmática do receptor e a forma tomada pela célula, sugerindo uma provável microglia em estado de ativação (100x). **M.** Marcação citoplasmática ao redor de célula do corpo medular de cerebelo do grupo UChB+caféina. Nota-se positividade menos evidente (40x). **N.** Marcação citoplasmática ao redor de célula do corpo medular de cerebelo do grupo Controle. Nota-se positividade menos evidente (40x). **O.** Fotomicrografia das camadas cerebelares molecular, de Purkinje e granular do grupo UChB, mostrando imunopositividade restrita a células da glia do corpo medular (40x). **P.** Raramente, foram observadas células marcadas também para prováveis células imunes (seta) mergulhadas na camada granular (40x). Em detalhe, célula imune com positividade para A2a na camada granular do cerebelo do grupo UChB (100x).

Para o receptor de adenosina A1, a marcação nas camadas cerebelares se mostrou evidente do que para o A2a (Fig.13 e 14).

Para os Astrócitos de Bergmann, células de Purkinje e neurônios de Golgi, a resposta tecidual foi semelhante verificando-se diminuição da imunomarcação de A1 para o grupo UChB em relação aos grupos UChB+caféina e Controle. Para estes últimos grupos, a imunomarcação manteve-se elevada.

Para os neurônios Granulares, a resposta tecidual foi oposta ao observado para os Astrócitos de Bergmann e células de Purkinje, mostrando elevada frequência de marcação para o grupo UChB e menor reatividade para os grupos UChB+caféina e Controle.

Para as células da Substância Branca diminuição do A1 foi identificada após o consumo de caféina para o grupo UChB+caféina. A imunopositividade para esse antígeno foi equivalente entre os grupos UChB e Controle.

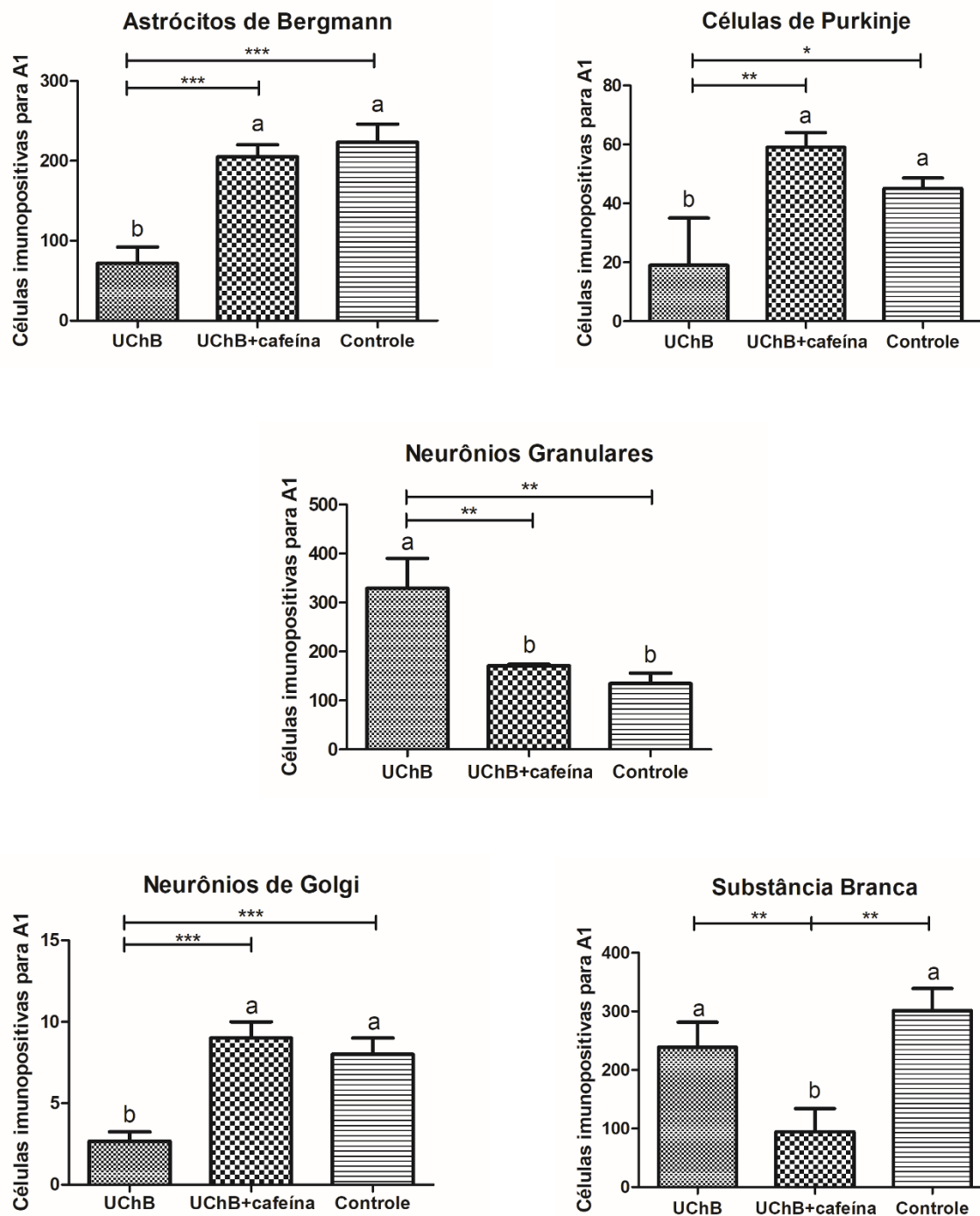


Figura 13. Análises do número de células imunopositivas para o receptor de adenosina A1 para diferentes tipos celulares no tecido cerebelar. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

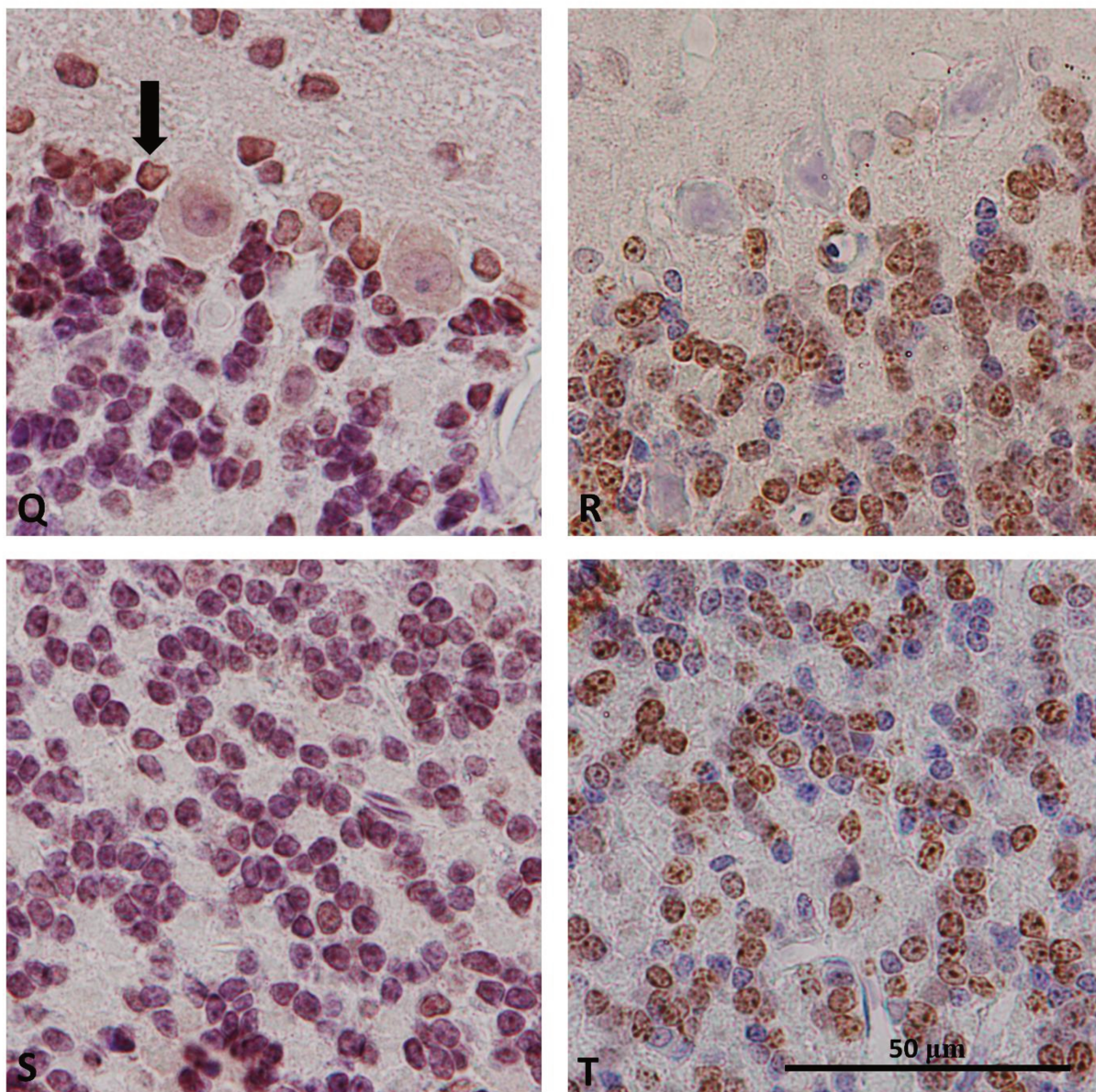


Figura 14. Imunomarcaco do receptor adenosinérgico A1 no tecido cerebelar dos grupos analisados. **Q.** Imunomarcaco evidente para o antígeno nas células de Purkinje e Astrócitos de Bergmann (seta) do grupo UChB+caféina. Nota-se baixa imunorreatividade para neurônios da camada granular (100x). **R.** Imunomarcaco pouco evidente para o receptor nas células de Purkinje e Astrócitos de Bergmann do grupo UChB (100x). **S.** Imunomarcaco baixa para A1 nos neurônios granulares do grupo Controle (100x). **T.** Imunomarcaco amplamente positiva para o antígeno nos neurônios granulares do grupo UChB (100X). A escala mostrada no canto inferior direito da figura T  comum para Q, R e S.

5.4. DISCUSSÃO

A citoarquitetura cerebelar é essencialmente constante ao longo de todo o órgão, característica que é fundamental para a manutenção da sua funcionalidade (SCHMAHMANN, 2019). No presente estudo, a estrutura cerebelar refletiu a capacidade do etanol e da cafeína em alterar os níveis proteicos e a imunolocalização de marcadores inflamatórios e adenosinérgicos para cada um dos tipos celulares analisados. Assim, sugere-se que há uma sensibilidade diferencial dos componentes celulares do cerebelo que, de certa forma, remete ao nível de comprometimento do órgão frente ao consumo crônico das substâncias disponibilizadas aos animais.

A cafeína, uma xantina alcalóide amplamente consumida, demonstrou efeito importante na modulação dos marcadores investigados, sugerindo papel protetor tecidual se considerando a tendência de retorno ao estágio de normalidade do tecido, equiparando o grupo UChB+cafeína ao grupo Controle.

O aumento dos níveis proteicos dos marcadores inflamatórios, principalmente NFkB e TLR4, para o grupo UChB está em consonância com estudos prévios em que o consumo crônico de etanol levou ao estabelecimento da neuroinflamação (CREWS et al.; 2017). Flores-Bastías & Kharahanian (2018) apresentaram em recente revisão que o consumo excessivo de etanol induz à resposta inflamatória no SNC através da sinalização via TNF α , TLR4 e NFkB. De acordo com a literatura, essa resposta parece iniciar-se a nível molecular, com aumento da expressão gênica dos marcadores inflamatórios. ZOU e CREWS (2010) identificaram aumento da expressão gênica de NFkB, TNF- α , iNOS e MCP-1 em cultura de córtex hipocampal-entorrinal incubada com etanol. De maneira semelhante, Lippai e colaboradores (2013) encontraram aumento da expressão gênica de TNF- α , MCP-1 e TLR4 em ratos que consumiram etanol cronicamente.

No presente estudo, alterações nas expressões gênicas para o NFkB e para o TLR4 não foram verificadas dentre os três grupos estudados. Assim, pode-se hipotetizar que a inexistência de diferença em nível molecular para estes marcadores estaria relacionada ao modelo experimental utilizado, destacando uma importante característica dos ratos UChB: o desenvolvimento da tolerância em alguns aspectos moleculares da resposta ao consumo de etanol (QUINTANILLA et al., 2006).

A expressão do NFkB é comumente evidente nas células da glia, por ser um fator de transcrição fundamental para a ativação da resposta imune inata a estímulos como estresse gerado por espécies reativas de oxigênio (EROs) e substâncias químicas (ZOU & CREWS, 2010;

YOKOVLEVA et al.; 2011). Os resultados de imunohistoquímica ressaltaram frequente imunolocalização do NFkB para os Astrócitos de Bergmann, aumentados para o grupo UChB. O mesmo repetiu-se para a imunomarcção do TLR4, evidente para esse mesmo tipo celular. Tal resultado é compatível com o fato de que outro mecanismo que induz à ativação do NFkB envolve a via de sinalização do TLR4, receptor que também é altamente expressivo em células da glia. A ação do TLR4 está relacionada a ativação da resposta inflamatória na presença de etanol (ALFONSO-LOECHES et al.; 2010, FERNANDEZ-LIZARBE et al.; 2013). Assim, a alta expressividade desses marcadores para os Astrócitos de Bergmann é condizente com o aumento do nível proteico cerebelar tanto para o TLR4 quanto para o NFkB.

Yang et al. (2014) demonstraram que após o consumo crônico de etanol houve redução do número de ramificações dos Astrócitos de Bergmann. O aumento da expressão do NFkB e do TLR4 vistos nesse tipo celular podem ser indicadores dessa degeneração, uma vez que a neuroinflamação é tida como um dos eixos da neurodegeneração (HEIMFARTH et al.; 2013). Estudos indicaram que a manutenção da morfologia desses astrócitos contribui para a sobrevivência das células de Purkinje em cerebelos adultos (CUI et al., 2001; YAMADA & WATANABE, 2002). Assim, considerando a maior frequência de imunomarcção para as células de Purkinje no grupo UChB para estes mesmos marcadores inflamatórios NFkB e TLR4, podemos sugerir no presente estudo uma possível relação entre o processo de inflamação estabelecido entre os Astrócitos de Bergmann e os neurônios de Purkinje.

Segundo Martinez e colaboradores (2018) é fato que tal resposta inflamatória conduz ao dano e morte neuronal como visto pelo aumento da expressão de Caspase-3 após o consumo de etanol em ratos UChB (MARTINEZ et al. 2018). Nesse mesmo estudo, avaliou-se o efeito do consumo concomitante de etanol e cafeína, de maneira semelhante ao presente estudo, e obteve-se diminuição da expressão de Caspase-3 com consequente atenuação da morte neuronal para o grupo que ingeriu cafeína. No presente estudo, os níveis proteicos de TLR4 e NFkB mostraram-se diminuídos e equiparáveis entre o grupo UChB+cafeína e Controle, apontando a capacidade da cafeína em influenciar na sinalização da neuroinflamação, principalmente através dos níveis proteicos de moléculas envolvidas nesse complexo processo.

Para os neurônios granulares, a administração da cafeína teve ação de atenuar a expressão de NFkB e, principalmente, de TLR4 a níveis menores do que os grupos UChB e Controle. Oliveira et al. (2014) relataram aumento da expressão de Caspase-3 e XIAP para os neurônios granulares

de ratos UChA. A ação do etanol sobre os neurônios granulares é reconhecidamente prejudicial, levando à apoptose dos mesmos pela ativação de vias como a do NFkB (LUO et al.; 2012).

De acordo com Baonig et al. (2018), o consumo de etanol é capaz também de elevar os níveis de NFkB através da via TLR2/MyD88. Nesse estudo, relataram aumento da expressão dos níveis proteicos de TLR2, IL-1 β , MyD88 e NFkB em células BV2 incubadas com etanol. No presente estudo, observou-se aumento significativo do TLR2 para o grupo UChB e diminuição desse marcador para o grupo UChB+caféina. Em relação ao grupo Controle, o grupo UChB+caféina manteve ainda níveis proteicos elevados em relação ao grupo Controle. Na literatura, reconhece-se o MyD88 como molécula adaptadora essencial para a ativação dos TLR4 e TLR2 (FITZGERALD et al.; 2001; O'NEIL et al.; 2003).

Os resultados apresentados demonstram que a expressão de MyD88 manteve-se condizente entre as técnicas realizadas: a caféina diminuiu a expressão gênica e os níveis proteicos desse marcador para o tecido cerebelar do grupo UChB+caféina. Além disso, a imunolocalização desse antígeno foi menor para o grupo UChB+caféina em quase todos os tipos celulares analisados. Em particular, para as células de Purkinje, houve notável diminuição do número de células imunopositivas para o MyD88 nos grupos em que houve consumo de etanol. Aumento na imunopositividade de neurônios de Purkinje para o grupo Controle foi caracterizado, indicando que um dos fatores responsáveis pelo aumento do nível proteico cerebelar desse adaptador para o grupo Controle.

A caféina possui efeito psicotrópico conhecido e estudado, mas a sua ação imunomoduladora é pouco conhecida (REEF&GANEN, 2018). A dosagem de 100 mg/dia de caféina é reportada como capaz de afetar positivamente ampla gama de funções cognitivas, diminuir a letargia e a fadiga, e aumentar o vigor. No entanto, altas concentrações de caféina, superiores a 400 mg/dia podem se tornar tóxicas e induzir ao vômito, dor abdominal e rabdomiólise (JUDELSON et al., 2013). Por pertencer à família das metilxantinas, é derivada da purina, em específico, da guanina. Uma das formas de agir em diferentes tipos celulares é através da ligação a análogos de purina, os chamados receptores adenosinérgicos, sendo o A1 o mais abundante no encéfalo (IGLESIAS et al., 2014; HACK & CHRISTIE, 2003). Ao se ligar ao receptor A1, a principal ação da adenosina é a diminuição da adenililciclase, levando à diminuição do AMPc, hiperpolarização celular por efluxo de K⁺ e inibição do cálcio circulante. Sendo assim, as ações decorrentes da ativação do A1 são sumariamente inibitórias (KANYSHKOVA et al., 2009). A

caféina antagoniza os efeitos da adenosina no cérebro, aumentando o fluxo sanguíneo, reduzindo o sono e melhorando o alerta e o desempenho físico (VOLKOW et al., 2015)

De acordo com Fang et al. (2017), o consumo de etanol apresentou efeitos sobre os receptores adenosinérgicos, inferindo-se, inclusive, que os efeitos hipnóticos decorrentes do consumo de álcool tenha se dado pela modulação de tais receptores e que o pré-tratamento com caféina foi capaz de conter parte desses efeitos através da sua ação no sistema adenosinérgico. A ingestão de etanol aumenta os níveis endógenos de adenosina, uma vez que é capaz de bloquear o transportador de nucleosídeo ENT1 (HACK & CHRISTIE, 2003). Após o consumo agudo de etanol, ocorre diminuição na produção de AMPc pela ativação dos receptores A1, uma vez que ocorre aumento da sinalização desse receptor (ELMENHORST et al.; 2018). No consumo crônico, no entanto, a diminuição de adenililciclase e AMPc ocorre por dessensitização dos receptores A1 (KOVACS & TOLDY, 2003).

No presente estudo, a expressão gênica do A1 aumentou para o grupo UChB. Em contrapartida, os níveis proteicos de A1 encontraram-se diminuídos para esse grupo, indicando diminuição do tônus adenosinérgico para o A1 a partir do consumo de etanol. De acordo com Hack e Christie (2003), a diminuição do A1 é esperada após o consumo crônico de etanol. Em estudo de Zhang et al. (2016), o consumo de etanol conduziu a diminuição da sinalização adenosinérgica através do receptor A1 no hipocampo de camundongos. Assim, sugere-se que o aumento da expressão gênica do A1, encontrado no grupo UChB, poderia refletir a tentativa de recuperação, a partir da maior expressão gênica, dos níveis proteicos desse receptor.

Os resultados apresentados demonstram que os níveis do receptor A1 foram restaurados no cerebelo dos animais UChB após o consumo de caféina, apesar do consumo de etanol, a níveis equivalentes ao grupo Controle. Tal resultado é condizente com a literatura, uma vez que reportou-se que o consumo crônico de caféina é capaz de aumentar níveis de A1 no SNC (JACOBSEN, VON LUBITZ & FREDHOLM, 1996). Quanto à imunopositividade desse antígeno, aumento da frequência de células marcadas foi verificado para os Astrócitos de Bergmann, neurônios de Purkinje e Golgi para os grupos UChB+caféina, em relação ao grupo UChB. Tal fato, indicou similaridade de resposta biológica nessas camadas corticais entre os grupos UChB+caféina e Controle, caracterizando tendência de retornar à normalidade tecidual. Os neurônios granulares foram os únicos tipos celulares em que houve aumento do receptor A1 no grupo UChB. Tal

aumento pode ser explicado pelo fato de que um dos locais de preferencial de ocorrência desse receptor no cerebelo são justamente os neurônios granulares (DAR, 1998).

Além do A1, a cafeína apresenta alta afinidade de ligação aos receptores A2a, receptores de adenosina que, ao contrário do A1, tem expressão mais circunscrita, sendo encontrados principalmente no *striatum*, tubérculo olfatório e núcleo accumbens (MOREAU, 1999). Porém, podem ser vistos também na superfície de células imunes, em especial em macrófagos, evidenciando seu papel relacionado à resposta imune (OHTA AND SITKOVSKY, 2001). Além disso, as ações a partir da ativação desse receptor são consideradas excitatórias, uma vez que levam ao aumento da adenililciclase e da concentração de AMPc, diferentemente da ativação do A1. Uma vez que a cafeína se liga ao receptor A2a, a adenililciclase é ativada, convertendo ATP em AMPc. Essa condição induz à cascata intracelular mediada pelo aumento do AMPc via inibição da fosfodiesterase (PDE). Assim, a ligação extracelular da cafeína amplifica a ação do AMPc no compartimento intracelular, agindo tal substância como inibidora da PDE. As altas concentrações de AMPc ativam a PKA (protein kinase A), que em troca, bloqueia a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Em consequência, agindo sobre células imunes, tal processo é capaz de modular a expressão de receptores tipo Toll (TLR's) e MHC-I (REEF & GHANEN, 2018). A redução dos níveis de TLR1 and TLR2 em humanos (CHAVEZ-VALDEZ et al., 2016) e TLR4 em ratos (MOLINA et al., 2015) como visto neste estudo, favorecem o microambiente anti-inflamatório produzido pela cafeína.

Ainda em relação ao A2a, existe aparente paradoxo sobre o seu papel na inflamação. Na periferia, a sinalização através desse receptor suprime tal processo (SITKOVSKY, 2003). No SNC, a ativação do A2a agrava a resposta inflamatória, principalmente sob condições crônicas (CUNHA, CHEN & SITKOVSKY, 2007). Os mecanismos através dos quais o bloqueio dos receptores A2a conferem neuroproteção ainda permanecem pouco esclarecidos, mas uma das hipóteses centrais trata-se do controle da neuroinflamação mediada pela micróglia (SANTIAGO, BAPTISTA & SANTOS, 2014). Estudos sugeriram que a ativação dos receptores A2a resulta em fenótipos reativos de micróglia, levando ao aumento de fatores neurotóxicos e de elementos não celulares que culminam no estabelecimento da neuroinflamação (BOIA; AMBROSIO; SANTIAGO, 2016).

No presente estudo, aumento significativo na expressão gênica e nos níveis proteicos do receptor A2a foi observado no cerebelo para grupo UChB. Assim, infere-se que houve indução de maior reatividade microglial para esse grupo em decorrência do consumo de etanol, condizente

com o aumento da neuroinflamação. A imunomarcagem específica desse antígeno para células da glia do corpo medular do cerebelo sugerem sua localização em células imunes, como a micróglia. O grupo UChB+caféina demonstrou níveis reduzidos desse receptor, comparáveis ao grupo Controle. Assim, confirma-se que a caféina parece atenuar a reatividade microglial, controlando a exacerbação da inflamação e promovendo a neuroproteção (MADEIRA et al.; 2017). Além disso, morfologia microglial presente no cerebelo dos animais do grupo UChB se assemelha aos fenótipos mais reativos da micróglia, podendo ser ela ramificada ou ativada. Nos grupos controle ou UChB+caféina, seu aspecto é aparentemente ameboide (CAI, HUSSAIN & YUAN, 2013).

Em geral, assume-se que o A1 desempenha papel de neuroproteção, uma vez que sua ativação leva à menor liberação de glutamato e hiperpolariza os neurônios (CUNHA et al.; 2005). De fato, em condições de ingestão etanólica agudas, a ativação do A1 atenua o dano cerebral e o seu bloqueio parece exacerbar o dano em animais adultos, como reportado por Mendonça, Sebastião e Ribeiro (2000). Em condições tóxicas crônicas, que levam ao aumento na liberação de adenosina, ocorre uma dessensitização, com diminuição da expressão central dos receptores A1, através do processo de *long-term potentiation* (WETHERINGTON; LAMBERT, 2002). O consumo de etanol eleva os níveis de adenosina livre no SNC (MENG; DAR; 1995; SHARMA et al., 2010). No estudo aqui apresentado, observou-se diminuição do receptor A1 para o grupo UChB, frente à situação crônica de alcoolismo à qual esses animais foram submetidos. Concomitantemente, aumento considerável da expressão proteica dos marcadores inflamatórios foi evidenciado como o TLR4, NFkB e MyD88. A administração de caféina foi capaz de restaurar a expressão do A1 no cerebelo do grupo UChB+caféina.

Em contraste, os receptores A2a são aumentados no encéfalo sob situações crônicas tóxicas e o seu bloqueio confere robusta neuroproteção em animais adultos (CUNHA et al., 2005). No presente estudo, o aumento do A2a também correlaciona-se com o aumento dos marcadores inflamatórios, tendo em vista o papel imune desse receptor. A caféina foi capaz de diminuir a expressão do A2a, contribuindo com a neuroproteção. Assim, infere-se que os receptores adenosinérgicos tem associação com a ativação do processo inflamatório no cerebelo de animais UChB e que a administração de caféina foi capaz de, através da modulação do A1 e do A2a, articular a atenuação do processo de inflamação do cerebelo do grupo UChB+caféina.

5.5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, concluiu-se que o etanol levou ao aumento dos marcadores inflamatórios NFkB, TLR4, MyD88 e TLR2 no cerebelo de ratos UChB. Além disso, interferiu também na expressão dos receptores adenosinérgicos A1 e A2a, propiciando a criação de um microambiente inflamatório. A cafeína atenuou a expressão dos marcadores inflamatórios, além de reestabelecer os receptores adenosinérgicos, indicando papel neuroprotetor.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a Wanderley Thiago da Silva pelo cuidado dos animais durante o período de experimentação e a Gelson Rodrigues pelo suporte técnico.

AUXÍLIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2016/07410-8) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não houve nenhum conflito de interesse.

5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFONSO-LOECHES, S. et al. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 8285–8295, 2010.

AUTTI-RÄMÖ, I. et al. MRI findings in children with school problems who had been exposed prenatally to alcohol. **Developmental medicine and child neurology**, v. 44, n. 2, p. 98–106, fev. 2002.

BAGHERI, F. et al. Melatonin prevents oxidative damage induced by maternal ethanol administration and reduces homocysteine in the cerebellum of rat pups. **Behavioral Brain Research**, v. 287, p. 215-225, 2015.

BAONING, Q. et al. Resveratrol alleviates ethanol-induced neuroinflammation in vivo and in vitro: Involvement of TLR2-MyD88-NF-κB pathway. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 103, p. 56-64, 2018.

BOIA, R.; AMBROSIO, A. F.; SANTIAGO, A. R. therapeutic opportunities for caffeine and a2a receptor antagonists in retinal diseases. **Ophthalmic Research**, v. 55, n. 4, p. 212–218, 2016.

BORGHI, A.; VERSTREPEN, L.; BEYAERT, R. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- κ B, MAP kinases and cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 116, p. 1–10, 2016.

BROTHERS, H. M.; MARCHALANT, Y.; WENK, G. L. Caffeine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. **Neuroscience Letters**, v. 480, n. 2, p. 97–100, 2010.

BUTLER, T. R.; PRENDERGAST, M. A. Neuroadaptations in adenosine receptor signaling following long-term ethanol exposure and withdrawal. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 1, 2012.

CAI, Z.; HUSSAIN, M. D.; YAN, L. G. Microglia, neuroinflammation, and A β in Alzheimer's disease. **The International journal of neuroscience**, v. 124 n.5, 2013.

CHAVEZ-VALDEZ, R.; AHLAWAT, R.; WILLS-KARP, M.; GAUDA, E.B. Mechanisms of modulation of cytokine release by human cord blood monocytes exposed to high concentrations of caffeine. **Pediatric Research**, v.80, p.101–109, 2016.

CREWS, F. T. et al. The role of neuroimmune signaling in alcoholism. **Neuropharmacology**, p. 1–18, 2017.

CREWS, F.T. et al, Cytokines and alcohol. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.30, p.720-730, 2006.

CUI, W. et al. Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. **Glia**, v. 34, n. 4, p.272–282, 2001.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 2, p. 111–134, 2005.

CUNHA, R. A.; CHEN, J. F.; SITKOVSKY, M. V. Opposite modulation of peripheral inflammation and neuroinflammation by adenosine A2A receptors in interaction between neurons and glia in aging and disease, **Springer, New York**, p. 53–79, 2007.

DAR, M. S. Involvement of kappa-opioids in the mouse cerebellar adenosinergic modulation of ethanol-induced motor incoordination. **Alcohol Clinical Experimental Research**, v.22, n.2, p.444-54, 1998.

DLUGOS, C. A. Ethanol-induced alterations in Purkinje neuron dendrites in adult and aging rats: a review. **Cerebellum**, v. 14, n. 4, p. 466-473, 2015.

DOEPKER, C. et al. Caffeine: Friend or Foe? **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, 2016.

during pregnancy on Adenosine A1 and A2A receptors signaling in both maternal and fetal heart from Wistar rats. **Journal of Caffeine Research**, v.4, p. 115-126, 2014.

ELMENHORST, E. M. et al. Cognitive impairments by alcohol and sleep deprivation indicate trait characteristics and a potential role for adenosine A1 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 31, 8009-8014, 2018.

FANG, T. et al. Adenosine A_{2A} receptor mediates hypnotic effects of ethanol in mice. **Science Reports**, v. 7, n. 12678, 2017.

FERNANDEZ-LIZARBE, S.; MONTESINOS, J.; GUERRI, C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, n. 2, p. 261–273, 2013.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 857–872, 2004.

FITZGERALD, K. A. et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. **Nature**, v.413, n. 6851, p.78-83, 2001.

FLORES-BASTÍAS, O.; KARAHANIAN, E. Neuroinflammation produced by heavy alcohol intake is due to loops of interactions between Toll-like 4 and TNF receptors, peroxisome proliferator-activated receptors and the central melanocortin system: A novel hypothesis and new therapeutic avenues. **Neuropharmacology**, v. 128, p. 401-407, 2018.

FREDHOLM, B. B.; YANG, J.; WANG, Y. Low, but not high, dose caffeine is a readily available probe for adenosine actions. **Molecular Aspects of Medicine**, p. 1–6, 2016.

GHIMIRE, S. R. et al. Effect of maternal alcohol consumption on cerebellum of rat pups: a histological study. **Nepal Medical College journal**, v. 11, n. 4, p. 268–71, 2009.

GONZALEZ-MENENDEZ, R. A. Alcohol Control in Cuba: Preventing Countervailing Cultural and Mass Media Influences. **MEDICC review**, v. 18, n. 3, p. 29–31, 2016.

HACK, S. P.; CHRISTIE, M. J. Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 15, p. 235-74, 2003.

HEIMFARTH, L. et al. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride. **NeuroToxicology**, v. 34, n. 1, p. 175–188, 2013.

HILLEMACHER, T.; LEGGIO, L.; HEBERLEIN, A. Investigational therapies for the pharmacological treatment of alcoholism. **Expert Opinions Investigational Drugs**, v. 24, n. 1, p.17-30, 2015.

IGLESIAS, I.; ALBASANZ, J.L.; MARTIN, M. Effect of caffeine chronically consumed
JAATINEN, P.; RINTALA, J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. **Cerebellum**, v. 7, n. 3, p. 332–347, 12 set. 2008.

JACOBSEN, K. et al. Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. **Trends Pharmacological Sciences**, v. 17, p. 108–113, 1996.

JUDELSON, D.A. et al. Effects of theobromine and caffeine on mood and vigilance. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 33, 499–506, 2013.

KANYSHKOVA, T. et al. Postnatal expression pattern of HCN channel isoforms in thalamic neurons: relationship to maturation of thalamocortical oscillations. **Journal of Neuroscience**, v.29, p. 8847–8857, 2009.

KOVACS, G. L.; TOLDY, E. Basal and isoproterenol-stimulated cyclic-adenosine monophosphate levels in mouse hippocampus and lymphocytes during alcohol tolerance and withdrawal. **Alcohol and Alcoholism**, v. 38, n. 1, p. 11–17, 2003.

KRANZLER, H. R.; SOYKA, M. Diagnosis and pharmacotherapy of alcohol use disorder: a review. **JAMA**, v. 320, n. 8, p. 815-824, 2018.

KUO, W. N. et al. Changes in the activities of protein kinase modulators in the cerebellum of mice due to ethanol, caffeine, or phenobarbital administration. **Experientia**, v. 35, n. 8, p. 997–8, 1979.

LUO, J. Effects of ethanol on the cerebellum: Advances and prospects. **Cerebellum**, v. 14, n. 4, p. 383–385, 2015.

LUO, J. mechanisms of ethanol-induced death of cerebellar granule cells. **Cerebellum**, v.11, n. 1, p.145–154, 2012.

MADEIRA M. H. et al. Having a Coffee Break: the impact of caffeine consumption on microglia-mediated inflammation in neurodegenerative diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2017, n.4761081, 2017.

MADEIRA, M. H. et al. Caffeine administration prevents retinal neuroinflammation and loss of retinal ganglion cells in an animal model of glaucoma. **Scientific Reports**, v. 6, n. 27532, 2016.

MARDONES, J.; SEGOVIA-RIQUELME, N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. **Neurobehavioral toxicology and teratology**, v. 5, n. 2, p. 171–8.

MARTINEZ, M. et al. Ethanol intake-induced apoptosis in glial cells and axonal disorders in the cerebellar white matter of UChA rats (voluntary ethanol consumers). **Tissue and Cell**, v. 47, n. 4, p. 389-394, 2015.

MARTINEZ, M. et al. Interactions of ethanol and caffeine on apoptosis in the rat cerebellum (voluntary ethanol consumers). **Cell Biology International**, v. 42, n.11, p. 1575-83, 2018.

MENDONÇA, A.; SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine: Does it have a neuroprotective role after all? **Brain Research Reviews**, v.33, p. 258-74, 2000.

MENG, Z. H., DAR, M. S. Possible role of striatal adenosine in the modulation of acute ethanol-induced motor incoordination in rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.19, p.892–901, 1995.

MOLINA, N.; BOLIN, A.P.; OTTON, R. Green tea polyphenols change the profile of inflammatory cytokine release from lymphocytes of obese and lean rats and protect against oxidative damage. **International Immunopharmacology**, v. 28, p. 985–996, 2016.

MOREAU, J. L.; HUBER, G. Central adenosine A_{2A} receptors: an overview. **Brain Research Reviews**, v.31, p. 65-82, 1999.

NORONHA, A. B. C. et al. Neurobiology of alcohol dependence. London, England: Academic Press; 2014. In: KRANZLER, H. R.; SOYKA, M. Diagnosis and pharmacotherapy of alcohol use disorder: a review. **JAMA**, v. 320, n. 8, p. 815-824, 2018.

O'NEILL, L. A. et al. Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors. **Journal of Endotoxin Research**, v.9, n.1, p.55-9, 2003.

OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature**, v. 414, n. 6866, p. 916-20, 2001.

OLIVEIRA, S. A. et al. Apoptosis of Purkinje and Granular cells of the cerebellum following chronic ethanol intake. **Cerebellum**, v. 13, n. 6, p. 728–738, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global status report on alcohol and health. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**, 2018.

PARKINSON, F. E. et al. Transgenic expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 2, p. 562–572, 2009.

PEANA, A. et al. From ethanol to salsolinol: role of ethanol metabolites in the effects of ethanol. **Journal of Experimental Neuroscience**, v. 10, p. 137, 2016.

PELELI, M. et al. Pharmacological targeting of adenosine receptor signaling. **Molecular Aspects of Medicine**, p. 1–5, 2017.

POLI, A. et al. Moderate alcohol use and health: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 6, p. 487–504, 2013.

QUINTANILLA, M. E. et al. The UChA and UChB rat lines: Metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. **Addiction Biology**, v. 11, n. 3–4, p. 310–323, 2006.

REEF, T. A.; GHANEN, E. Well-known as psychotropic substance, but little as immunomodulator. **Immunobiology**, v. 223, p. 818 – 825, 2018.

RUBY, C. L. et al. Adenosine and glutamate in neuroglial interaction: implications for circadian disorders and alcoholism. **Advances in neurobiology**, v. 11, p. 103–119, 2014.

SANTIAGO, A. R. et al. Role of microglia adenosine A2A receptors in retinal and brain neurodegenerative diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, n. 465694, 2014

SCHMAHMANN, J. D. The cerebellum and cognition. **Neuroscience Letters**, v.1, n. 668, p.62-75, 2019.

SHARMA, R. et al. Effects of ethanol on extracellular levels of adenosine in the basal forebrain: An in vivo microdialysis study in freely behaving rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 34, n. 5, p.813-818, 2010.

SITKOVSKY, M. V. Use of the A2A adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. **Biochemical Pharmacology**, vol. 65, n. 4, p. 493–501, 2003.

TSUTSUI, S. et al. Neurobiology of disease A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. **Neurobiology of Disease**, p. 1521–1529, 2004.

ULLAH, F. et al. Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 114–124, 2015.

VALLES, S.L. et al. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. **Brain Pathology**, v.14, p.365–371, 2004.

VETRENO, R. P. et al. Persistent adult neuroimmune activation and loss of hippocampal neurogenesis following adolescent ethanol exposure: blockade by exercise and the anti-inflammatory drug indomethacin. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 1–18, 2018.

VOLKOW, N. D. Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. **Translational Psychiatry**, v.5, n.4 e549.

VOZEH, F. Cerebellum -from J. E. Purkyně up to Contemporary Research. **Cerebellum**, v. 16, n.3, p. 691-4, 2017.

WAGNER, M. J. et al. Cerebellar granule cells encode the expectation of reward. **Nature Letters**, p. 1–18, 2017.

WARDAS, J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 54, p. 313–326, 2002.

WETHERINGTON, J. P.; LAMBERT, N. A. Differential desensitization of responses mediated by presynaptic and postsynaptic A1 adenosine receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 22, p.1248-55, 2002.

YAKOVLEVA, I. et al. Transcriptional control of maladaptive and protective responses in alcoholics: a role of the NF- κ B system. **Brain Behavioral Immunology**, v. 25, n.1, 2011.

YAMADA, K.; WATANABE, M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. **Anatomical Science International Journal**, v. 77, n. 2, p. 94–108, 2002.

YANG, Y. et al. Activation of liver X receptor is protective against ethanol-induced developmental impairment of Bergmann glia and Purkinje neurons in the mouse cerebellum. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n.1, p. 176-186, 2014.

ZHANG, D. et al. Ethanol tolerance affects endogenous adenosine signaling in mouse hippocampus. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.358, n.1, p. 31-38.

ZOU, J.; CREWS, F. Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: key role of NF- κ B and proinflammatory cytokines. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 34, n.5, p.777-89, 2010.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do presente estudo permitiu concluir que o consumo de etanol interfere no processo inflamatório e na sinalização adenosinérgica do tecido cerebelar. De ação evidente, a cafeína consumida em adição à solução de etanol contribuiu para o restabelecimento morfofisiológico do cerebelo, considerando-se como parâmetro a resposta dos marcadores teciduais apresentados pelo grupo Controle. Tal fato pôde ser verificado em nível molecular, através da expressão gênica, em níveis proteicos, através da análise de Western Blotting e imunohistoquímica. Ainda, através da imunomarcção dos antígenos, foi possível verificar que houve variação da localização dos marcadores escolhidos de acordo com o grupo e o tipo celular analisado, apontando para a interferência diferencial do etanol e da cafeína nas funções cerebelares, bem com variando a gravidade das injúrias estabelecidas.

Assim, a partir dos resultados obtidos no presente estudo concluiu-se que o etanol leva ao aumento dos marcadores inflamatórios NFkB, TLR4, MyD88 e TLR2 e interfere na modulação dos receptores adenosinérgicos A1 e A2a, corroborando para a criação de um microambiente inflamatório. A cafeína atenua a expressão dos marcadores inflamatórios além de reestabelecer os receptores adenosinérgicos, indicando papel neuroprotetor.

Também, a capacidade de ação das substâncias consumidas foi avaliada em níveis de miRNAs expressos no tecido cerebelar e no plasma sanguíneo dos animais. Tais resultados apontaram que os níveis plasmáticos dos miRNAs analisados nem sempre refletiram os níveis cerebelares dos mesmo, sugerindo que as análises desses marcadores devem sempre ser feitas em conjunto e nunca tomadas como parâmetros individuais.

Finalizando, conclui-se que o etanol é uma droga prejudicial ao cerebelo, levando a efetivo estado inflamatório e a cafeína tem papel neuroprotetor dentro deste órgão do Sistema Nervoso Central.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFONSO-LOECHES, S. et al. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 8285–8295, 2010.

AUTTI-RÄMÖ, I. et al. MRI findings in children with school problems who had been exposed prenatally to alcohol. **Developmental medicine and child neurology**, v. 44, n. 2, p. 98–106, fev. 2002.

BAGHERI, F. et al. Melatonin prevents oxidative damage induced by maternal ethanol administration and reduces homocysteine in the cerebellum of rat pups. **Behavioral Brain Research**, v. 287, p. 215-225, 2015.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, n.2, p.281-297, 2004.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, n.2, p.281-297, 2004.

BERESFORD, T. P.; WONGNGAMNIT, N.; TEMPLE, B. A. Alcoholism: diagnosis, prognosis, epidemiology, and burden of the disease. **Handbooks of neurology**, v.125, p. 3–13, 2014.

BOIA, R.; AMBROSIO, A. F.; SANTIAGO, A. R. Therapeutic Opportunities for Caffeine and A2A Receptor Antagonists in Retinal Diseases. **Ophthalmic Research**, v. 55, n. 4, p. 212–218, 2016.

BORGHI, A.; VERSTREPEN, L.; BEYAERT, R. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- κ B, MAP kinases and cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 116, p. 1–10, 2016.

BROTHERS, H. M.; MARCHALANT, Y.; WENK, G. L. Caffeine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. **Neuroscience Letters**, v. 480, n. 2, p. 97–100, 2010.

BUTLER, T. R.; PRENDERGAST, M. A. Neuroadaptations in adenosine receptor signaling following long-term ethanol exposure and withdrawal. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 1, 2012.

CREWS, F. T. et al. The role of neuroimmune signaling in alcoholism. **Neuropharmacology**, p. 1–18, 2017.

CREWS, F.T. et al, Cytokines and alcohol. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.30, p.720-730, 2006.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99–105, 2007.

DE MEJIA, E. G.; RAMIREZ-MARES, M. V. Impact of caffeine and coffee on our health. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 10, p. 489–492, 2014.

DENNY, L.; COLES, S.; BLITZ, R. Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **American family physician**, v. 96, n. 8, p. 515-522, 2017.

DLUGOS, C. A. Ethanol-induced alterations in Purkinje neuron dendrites in adult and aging rats: a review. **Cerebellum**, v. 14, n. 4, p. 466-473, 2015.

DOEPKER, C. et al. Caffeine: Friend or Foe? **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, p.117-137, 2016.

EDWARDS, G.; GROSS, M. M. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. **British medical journal**, v. 1, n. 6017, p. 1058–61, 1976.

FARRIS, S. P. et al. Applying the new genomics to alcohol dependence. **Alcohol**, v.49, n.8, p.825-836, 2015.

FERNANDEZ-LIZARBE, S. et al. Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. **Molecular Immunology**, v.45, p.2007–2016, 2008.

FERNANDEZ-LIZARBE, S.; MONTESINOS, J.; GUERRI, C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, n. 2, p. 261–273, 2013.

FERRÉ, S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 4, p. 1067–1079, 2008.

FERRÉ, S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. SUPPL.1, 2010.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 857–872, 2004

FREDHOLM, B. B.; YANG, J.; WANG, Y. Low, but not high, dose caffeine is a readily available probe for adenosine actions. **Molecular Aspects of Medicine**, v.55, p. 20-25, 2017.

GATELY, I. Drink: A cultural history of alcohol. **Gotham Books**. Nova Iorque. 1ª Edição, 2008.

GAUDET, A. D. et al. MicroRNAs: Roles in regulating neuroinflammation. **The Neuroscientist**, v.24, n.2, p. 221-245, 2018.

GHIMIRE, S. R. et al. Effect of maternal alcohol consumption on cerebellum of rat pups: a histological study. **Nepal Medical College journal**, v. 11, n. 4, p. 268–71, 2009.

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. **Alcohol Research & Health**, v.31, p.185-195, 2008.

GONZALEZ-MENENDEZ, R. A. Alcohol Control in Cuba: Preventing Countervailing Cultural and Mass Media Influences. **MEDICC review**, v. 18, n. 3, p. 29–31, 2016.

HASKÓ, G. et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 9, p. 759–70, 2008

HEIMFARTH, L. et al. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride. **NeuroToxicology**, v. 34, n. 1, p. 175–188, 2013.

HEYN, J. et al. Adenosine A2A Receptor Upregulation in Human PMNs Is Controlled by miRNA-214, miRNA-15, and miRNA-16. **Shock**, v. 37, n. 2, p. 156–163, 2012.

HILLEMACHER, T.; LEGGIO, L.; HEBERLEIN, A. Investigational therapies for the pharmacological treatment of alcoholism. **Expert Opinions Investigational Drugs**, v. 24, n. 1, p.17-30, 2015.

JAATINEN, P.; RINTALA, J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. **Cerebellum**, v. 7, n. 3, p. 332–347, 12 set. 2008.

KHADERI, SA. Introduction: Alcohol and Alcoholism. **Clinics in liver disease**, v.23, n.1, p.1-10, 2019.

KRANZLER, H. R.; SOYKA, M. Diagnosis and pharmacotherapy of alcohol use disorder: a review. **JAMA**, v. 320, n. 8, p. 815-824, 2018.

KUO, W. N. et al. Changes in the activities of protein kinase modulators in the cerebellum of mice due to ethanol, caffeine, or phenobarbital administration. **Experientia**, v. 35, n. 8, p. 997–8, 1979.

LIMOSIN, F. Mésusages d'alcool: les signaux d'alarme de l'épidémiologie. **L'Encéphale**, v. 40, n. 2, p. 129–135, 2014.

LIU, G.; ABRAHAM, E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 2, p. 170–177, 2013.

LUO, J. Effects of ethanol on the cerebellum: Advances and prospects. **Cerebellum**, v. 14, n. 4, p. 383–385, 2015.

MADEIRA, M. H. et al. Caffeine administration prevents retinal neuroinflammation and loss of retinal ganglion cells in an animal model of glaucoma. **Scientific Reports**, v. 6, n. 27532, 2016.

MARTINEZ, M. et al. Ethanol intake-induced apoptosis in glial cells and axonal disorders in the cerebellar white matter of UChA rats (voluntary ethanol consumers). **Tissue and Cell**, v. 47, n. 4, p. 389–394, 2015.

MARTINEZ, M. et al. Interactions of ethanol and caffeine on apoptosis in the rat cerebellum (voluntary ethanol consumers). **Cell Biology International**, v. 42, n.11, p. 1575–83, 2018.

MIRANDA, R. C. et al. MicroRNAs: Master regulators of ethanol abuse and toxicity? **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 34, n. 4, p. 575–587, 2010.

MONTESINOS, J. et al. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 45, p. 233–244, 2015.

NORONHA, A. B. C. et al. Neurobiology of alcohol dependence. London, England: Academic Press; 2014. In: KRANZLER, H. R.; SOYKA, M. Diagnosis and pharmacotherapy of alcohol use disorder: a review. **JAMA**, v. 320, n. 8, p. 815–824, 2018.

ODLAUG, B. L. et al. Alcohol dependence, co-occurring conditions and attributable burden. **Alcohol and Alcoholism**, v.51, n. 2, p. 201–209, 2016.

OLIVEIRA, S. A. et al. Apoptosis of Purkinje and Granular cells of the cerebellum following chronic ethanol intake. **Cerebellum**, v. 13, n. 6, p. 728–738, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global status report on alcohol and health. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**, 2018.

PARKINSON, F. E. et al. Transgenic expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 2, p. 562–572, 2009.

PASCUAL, M. et al. TLR4 response mediates ethanol-induced neurodevelopment alterations in a model of fetal alcohol spectrum disorders. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 145, 2017.

PEANA, A. et al. From ethanol to salsolinol: role of ethanol metabolites in the effects of ethanol. **Journal of Experimental Neuroscience**, v. 10, p. 137, 2016.

PELELI, M. et al. Pharmacological targeting of adenosine receptor signaling. **Molecular Aspects of Medicine**, p. 1–5, 2017.

POLI, A. et al. Moderate alcohol use and health: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 6, p. 487–504, 2013.

RUBY, C. L. et al. Adenosine and Glutamate in Neuroglial Interaction: Implications for Circadian Disorders and Alcoholism. In: **Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain**. [s.l: s.n.]. p. 103–119.

TSUTSUI, S. et al. Neurobiology of disease A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. **Neurobiology of Disease**, p. 1521–1529, 2004.

ULLAH, F. et al. Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 114–124, 2015.

VERHULST, B.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. The heritability of alcohol use disorders: a meta-analysis of twin and adoption studies. **Psychological Medicine**, v.45, n.5, p.1061-1072, 2015.

VETRENO, R. P. et al. Persistent adult neuroimmune activation and loss of hippocampal neurogenesis following adolescent ethanol exposure: blockade by exercise and the anti-inflammatory drug indomethacin. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 1–18, 2018.

VOZEH, F. Cerebellum -from J. E. Purkyně up to Contemporary Research. **Cerebellum**, v. 16, n.3, p. 691-4, 2017.

WAGNER, M. J. et al. Cerebellar granule cells encode the expectation of reward. **Nature Letters**, p. 1–18, 2017.

WANG, J.Z.; WANG, Z.H. Senescence may mediate conversion of tau phosphorylation-induced apoptotic escape to neurodegeneration. **Experimental Gerontology**, v. 68, p. 82–86, 2015.

WARDAS, J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 54, p. 313–326, 2002.

WU, W. et al. MicroRNA-206 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis via regulation of adenosine A3 receptor. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 705–721, 2016.

ZHANG, G.; GHOSH, S. NF- κ B in defense and disease Toll-like receptor - mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 13–19, 2001.

ZHAO, L. et al. The mutual regulation between miR-214 and A2AR signaling plays an important role in inflammatory response. **Cellular Signalling**, v. 27, n. 10, p. 2026–2034, 2015.

ANEXO I – Certificado de Aprovação CEUA UNICAMP



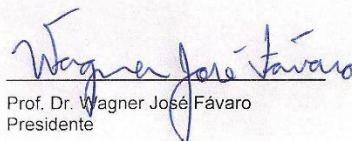
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Etanol e Cafeína: Interações das Expressões gênicas de NFκB, TLR4, A1, A2a e MicroRNAs na inflamação do cerebelo de ratos UChB (consumidores voluntários de etanol)**, registrada com o nº **4651-1/2017**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e Isabela Maria Urro Rossetto**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **21 de agosto de 2017**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/09/2017-01/09/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/09/2017-01/09/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / UChB
No. de animais:	40
Idade/Peso:	05 meses / 250g
Sexo:	machos
Origem:	UNESP/Campus Botucatu
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH Wistar
No. de animais:	20
Idade/Peso:	05 meses / 250g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 21 de agosto de 2017.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO II – Certificado de Aprovação CEUA

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "EFEITOS DO CONSUMO SIMULTÂNEO DE ETANOL E CAFEÍNA NA APOPTOSE NO CEREBELO DE RATOS UChB (consumidores voluntários de etanol): MicroRNAs e EXPRESSÕES GÊNICAS", protocolado sob o CEUA nº 9895280815, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Martinez** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) em reunião de 17/11/2015.

We certify that the proposal "SIMULTANEOUS INTAKE OF ETHANOL AND CAFFEINE ON APOPTOSIS IN THE CEREBELLUM OF UChB RATS (VOLUNTARY ETHANOL CONSUMERS): MicroRNAs AND GENE EXPRESSIONS", utilizing 30 Heterogenics rats (30 males), protocol number CEUA 9895280815, under the responsibility of **Prof. Dr. Marcelo Martinez** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 11/17/2015.

Vigência da Proposta: de 08/2015 a 08/2016

Laboratório: **Morfologia E Patologia**

Procedência: **Biotério Externo**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

Gênero: **Machos**

Idade: **5 a 5 meses** N: **30**

Linhagem: **Wistar e UChB**

Peso: **200 a 300 g**

Nota: A ingestão de bebidas energéticas (com cafeína) simultaneamente ao consumo de bebidas alcoólicas aumenta o risco de abuso e dependência alcoólica, pois está associada a um maior consumo de álcool tanto em quantidade como em frequência. Os riscos maléficos desta ingestão e ainda a falsa percepção de que a cafeína diminuiria os efeitos nocivos do álcool expõem o jovem e a sociedade a maiores riscos. Embora o cerebelo constitua apenas 10% do volume total do encéfalo, contém mais da metade de todos os neurônios do SNC. Atua como coordenador da motricidade participa da cognição, desenvolvimento e alterações psíquicas, possuindo conexões via tálamo para muitas áreas encefálicas relevantes a esses processos. Existe uma vasta literatura que mostra as lesões cerebelares decorrentes do consumo pós-natal de álcool, porém estudos do impacto do álcool sobre o adulto são menos frequentes. Por outro lado, análises dos efeitos simultâneos de etanol e cafeína sobre os neurônios cerebelares são escassos. Os objetivos do trabalho serão determinar o padrão de expressão de MiRNAs apoptóticos e anti-apoptóticos e analisar as expressões gênicas da Caspase-3 (apoptótico), XIAP (anti-apoptótico) e IGFR-1, visando contribuir para a compreensão das consequências do abuso do álcool e cafeína sobre o cerebelo.

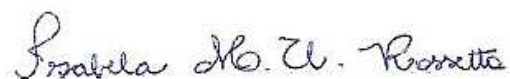
São Carlos, 17 de novembro de 2015

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

ANEXO III – Declaração de direitos autorais

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada Etanol e cafeína: interações das expressões gênicas de NFkB, TLR4, TLR2, MyD88, A1, A2a e miRNAs na inflamação do cerebelo de ratos UChB (consumidores voluntários de etanol) não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06 de maio de 2019.



Isabela Maria Urro Rossetto

RG n.º 40575297-0



Nome do(a) orientador(a): Marcelo Martinez

RG n.º 19423765