

ULTRAESTRUTURA, EXPRESSÃO GÊNICA E
IMUNOMARCAÇÃO DA CASPASE 3, XIAP E IGF-1R DO
CÓRTEX CEREBELAR DE RATOS UChA
(Consumidores voluntários de etanol)

SUELEN ALVES DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, como requisito
para obtenção do título de Doutor no Programa de
Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração Biologia Celular Estrutural e
Funcional (BCEF)

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

**BOTUCATU – SP
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ULTRAESTRUTURA, EXPRESSÃO GÊNICA E
IMUNOMARCAÇÃO DA CASPASE 3, XIAP E IGF-1R DO
CÓRTEX CEREBELAR DE RATOS UChA
(Consumidores voluntários de etanol)

SUELEN ALVES DE OLIVEIRA

PROF. DR. FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ

PROF. DR. MARCELO MARTINEZ

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, como requisito
para obtenção do título de Doutor no Programa de
Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração Área de concentração
Biologia Celular Estrutural e Funcional (BCEF)

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

**BOTUCATU – SP
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Oliveira, Suelen Alves de.

Ultraestrutura, expressão gênica e imunomarcação da caspase-3, XIAP, IGF-1R do córtex cerebelar de ratos UChA (consumidores voluntários de etanol) / Suelen Alves de Oliveira. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Coorientador: Marcelo Martinez

Capes: 20601000

1. Cerebelo. 2. Degeneração (Patologia). 2. Alcoolismo. 3. Apoptose.
4. Proteínas – Análise. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: XIAP, IGF-1R, caspase-3, cerebelo e ratos UChA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Suelen Alves de Oliveira

ULTRAESTRUTURA, EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNOMARCAÇÃO DA CASPASE 3,
XIAP E IGF-1R DO CÓRTEX CEREBELAR DE RATOS UChA

(Consumidores voluntários de etanol)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biologia Celular Estrutural e
Funcional (BCEF)

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À DEUS, fonte de luz, que concedeu-me coragem e perseverança para atingir meus objetivos.

A minha mãe, Aurea Isabel Vendrame, pelo apoio incansável e inabalável, por acreditar em meus sonhos e estar ao meu lado em todas as minhas decisões.

A minha irmã, Jaqueline Alves de Oliveira e ao meu cunhado Guilherme Carraro Giuliangeli, pela amizade, compreensão e companheirismo.

Ao meu marido, Cesar José Creste Martins da Costa, pelos momentos de apoio e paciência, por me ajudar em qualquer situação ou horário, pelas noites exaustivas que passou ao meu lado, por broncas necessárias e por seu amor, pois sem ele não conseguiria.

Dedico a vocês esse trabalho

Suelen Alves de Oliveira

Agradecimentos

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista pela oportunidade e por oferecer-me todas as condições necessárias para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez, pela orientação e pelo exemplo de docente e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Marcelo Martinez, meu coorientador, por toda dedicação, pela confiança, pelo carinho e paciência durante os anos de graduação e por todo o mestrado e agora no doutorado, pelas minhas conquistas acadêmicas e pessoais.

A todo corpo docente da pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada pelos ensinamentos durante a realização de suas disciplinas.

Ao Prof. Dr. Luiz Takase, pelas valiosas sugestões e orientações durante a realização desta pesquisa e também pelo incentivo e ensinamentos no campo da neuroanatomia.

A Prof^ª. Dra Maira Aparecida Stefanini, brilhante docente, exemplo de superação, garra e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli, os pós-graduandos Fermino Sanches Lizarte Neto e Paulo Cezar Novais, do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina USP Ribeirão Preto, por toda contribuição no desenvolvimento da pesquisa e pelos ensinamentos em biologia molecular.

Às minhas madrinhas, Roseli Aparecida Vendrame Merchan Ferraz e Sandra Brancalheão, ao meu padrinho Luiz Antonio Brancalheão, pelo amor e paciência.

Ao amigo, Altiman Alécio Peccioli Xavier, por sua sabedoria e por seu exemplo de perseverança em minha vida e para minha família.

Aos meus sogros Francisco Martins da Costa Filho e Maria Cristina Creste Martins da Costa pelo exemplo de fé e sabedoria. Por terem me proporcionado confiança quando achei que não conseguiria mais.

À minha prima Gabriela Vendrame Merchan Ferraz Aranda, seu marido Eduardo Aranda e a Maria Eduarda Aranda, pela amizade, apoio, confiança e por inúmeros momentos de felicidade.

Aos meus colegas de trabalho, pela compreensão neste período, onde a palavra cerebelo virou expressão de uso comum na UTI neonatal: vocês são especiais.

Aos meus chefes Dr. Fernando De Luca e Amanda Creste Martins da Costa Ribeiro Risso, por compreender as dificuldades do período de doutoramento, pelo apoio e amizade.

A pós-graduanda Beatriz Fioruci pelos ensinamentos em imunistoquímica e auxílio no desenvolvimento de técnicas experimentais.

Ao auxiliar acadêmico Gelson Rodrigues do Departamento de Anatomia IBB pelo auxílio durante o processamento dos materiais.

Ao Sr. Wanderley Thiago da Silva pelo cuidado com os animais.

Aos secretários da seção da Pós-Graduação por todos os serviços realizados e pela amizade durante este período.

Aos amigos do programa de pós-graduação pelo auxílio prestado e atenção.

À FAPESP por suporte financeiro (número do processo: 2011/50466-0).

*Nem todos os dias terminam como a gente quer,
mas todos os dias podem começar como a gente sonha.*

Saiba que bons dias te dão felicidade...

Maus dias te dão experiência...

Ambos são essenciais para a vida.

A felicidade te faz doce...

O problema te faz forte...

Os erros, te mantém humano...

A queda te faz humilde...

*Mas só Deus te dá força para
continuar a caminhada para vitória.*

(autor desconhecido)

RESUMO**ULTRAESTRUTURA, EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNOMARCAÇÃO DA CASPASE 3, XIAP E IGF-1R DO CÓRTEX CEREBELAR DE RATOS UChA (Consumidores voluntários de etanol)**

Suelen Alves de Oliveira

Introdução: O cerebelo é suscetível aos efeitos lesivos do etanol em exposições agudas ou crônicas, em diferentes idades, podendo ocasionar alterações motoras, de aprendizado, cognitivas e favorecer a morte celular apoptótica. Nosso objetivo foi avaliar a apoptose nos neurônios de Golgi, Purkinje e células granulares do cerebelo de ratos adultos da variedade UChA.

Metodologia: Os ratos foram divididos em dois grupos experimentais (20 ratos por grupo): um grupo controle, composto de animais UChA abstinentes e o grupo experimental, formado por ratos UChA, consumidores voluntários de etanol a 10% (< 2g etanol/Kg peso corpóreo/dia). Dos 65 dias aos 120 dias de idade, os animais receberam solução de etanol a 10%. Aos 120 dias, os animais foram anestesiados e preparados para eutanásia. O cerebelo foi então analisado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), imunistoquímica para apoptose, caspase-3 (pró-apoptótica), XIAP (antiapoptótica) e IGF-1R nos neurônios de Golgi, Purkinje e granulares. Avaliou-se também por RT-PCR os genes reguladores da caspase-3, XIAP e IGF-1R no córtex cerebelar dos grupos estudados.

Resultados: Os animais UChA mostraram acúmulo de gotas lipídicas, presença de núcleos eletrodensos nos neurônios granulares e de Purkinje, desorganização do corpo medular do cerebelo com alterações na bainha de mielina no córtex cerebelar. Identificou-se também aumento significativo na imunomarcagem de caspase-3 e XIAP nos neurônios de Purkinje e granulares. A fragmentação do DNA foi significativa nas células de Purkinje. O IGF-1R não apresentou alterações. Não houve diferenças significativas na expressão dos genes de caspase-3, XIAP, e o IGF-1R.

Conclusão: O etanol induz apoptose nas células de Purkinje e granulares do cerebelo de ratos adultos UChA.

Palavras-chaves: XIAP, IGF-1R, caspase-3, cerebelo e ratos UChA.

ABSTRACT**ULTRASTRUCTURE, GENE EXPRESSION AND IMMUNOSTAINING CASPASE 3,
XIAP, AND IGF-1R IN THE CEREBELLAR CORTEX OF UChA RATS
(Volunteer ethanol consumers)****Suelen Alves de Oliveira**

Introduction: The cerebellum is susceptible to the harmful effects of ethanol in acute or chronic exposures at different ages, which may cause motor, learning and cognitive disorders and promote apoptotic cell death (PCD) as well. Our objective was to evaluate apoptosis in Golgi and Purkinje neurons and in granular cell disease of the cerebellum of adult rats of the type UChA.

Methodology: The rats were divided in two experimental groups (20 rats per group): a control group, consisting of abstinent UChA animals and the experimental group, formed by UChA rats, volunteers consumers of 10% ethanol (< 2g ethanol / kg weight body / day). From 65 day-age to the 120 day-age, the animals received 10% ethanol solution. After 120 days, the rats were anesthetized and prepared for euthanasia. The cerebellum was then analyzed by transmission electron microscopy (TEM), immunohistochemistry to apoptosis, caspase-3 (pro-apoptotic), XIAP (anti-apoptotic) and IGF-1R in Golgi, Purkinje neurons and granular as well. It was also evaluated by RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) the regulatory genes caspase-3, XIAP and IGF-1R in the cerebellar cortex of groups.

Results: The UChA animals showed accumulation of lipid droplets, presence of electron-nuclei in granule neurons and Purkinje, disorganization of the medullary body of the cerebellum with some changes in the myelin sheath of the cortex. It was also identified significant increase in the Immunostaining caspase-3 and XIAP in Purkinje neurons and granular. The DNA fragmentation was significant in Purkinje cells. The IGF-1R didn't have any change though. There were no significant differences in the formulation of caspase-3 genes, XIAP and IGF-1R.

Conclusion: Ethanol induces apoptosis in granular and Purkinje cells of the cerebellum of adult UChA rats.

Keywords: XIAP, IGF-1R, caspase-3, cerebellum and UChA rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Componentes neuroinflamatórios do dano cerebral induzido por etanol	18
Figura 2a.	Fotomicrografias do cerebelo do rato.....	22
Figura 2b.	Fotomicrografias do cerebelo do rato.....	22
Figura 2c.	Fotomicrografias do cerebelo do rato.....	22

LISTA DE ABREVIACOES

AP:	Ântero-posterior;
APAF-1:	Fator ativador de proteases apoptóticas-1 (Apoptotic protease activating factor-1);
AP-1:	Ativador da proteína-1 (Activator protein-1);
AMS:	Atrofia de múltiplos sistemas;
ARE:	Elemento de resposta aos antioxidantes (Antioxidant response elements);
ATP:	Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate);
Bak:	Assassino 1 antagonista Bcl2 (Bcl2 antagonist killer 1);
Bax:	Proteína X associada à Bcl-2 (Bcl-2 associated X protein);
Bcl-2:	Proteína associada ao linfoma de células B2 (B-Cell Lymphoma 2);
Bcl-xl:	Gene relacionado ao Bcl-2, isoforma longa (Bcl-2 related gene, long isoform);
Bid:	Agonista de morte que interage com o domínio BH3 (BH3 interacting domain death agonist);
BIR:	Domínio repetido IAP de baculovirus (Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat);
CAD:	DNase ativada por caspase (Caspase activated DNase);
Caspases:	Cisteino-proteinase-aspártico-ase (Cystein-proteinase-asprtic-ase);
CD 14	Grupamento de diferenciação 14 (Cluster of differentiation 14);
CD95:	Receptor Fas (Fas receptor);
cDNA	DNA complementar (Complementary DNA);
COX-2:	Ciclooxigenase-2 (Cyclooxygenase-2);
DAMPS:	Padrões moleculares associados ao dano celular (Damage-associated molecular pattern);
DED:	Domínio efetor de morte (Death effector domain);
DNA:	cido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid);
EROS:	Espécies reativas ao oxignio (Reactive oxygen species);
Fas:	cido graxo sintetase (Fatty acid synthetase);
FasL:	Fas ligante (Fas ligand);

FADD:	Proteína associada a Fas com domínio de morte (FAS-associated death domain);
FASD:	Déficits decorrentes da Síndrome Fetal Alcoolica (Fetal alcohol spectrum disorder);
G:	Camada granular;
G1:	Período no ciclo celular durante a interfase;
GABA:	Ácido gama-aminobutírico (Gamma-aminobutyric acid);
GABA_A:	Receptor tipo A do ácido gama-aminobutírico (Gamma-aminobutyric acid ionotropic receptor family A);
GIRKs:	Proteína G ativada por canais de potássio (G protein activated potassium channel);
GSAP:	Proteína ativadora de gama-secretase (Gamma-secretase activating protein);
HSP:	Proteína do choque térmico (Heat shock protein);
IAP:	Proteínas inibidoras de apoptose (Inhibitor of apoptosis proteins);
ICAD:	Inibidor de CAD (Inhibitor of CAD);
IGF:	Fator de crescimento semelhante à insulina (Insulin growth factor);
IGF-1:	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (Insulin growth factor-1);
IGF-2:	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (Insulin growth factor-2);
IGF-1R:	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (Receptor - like growth factor insulin-1);
IGF-2R:	Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (Receptor - like growth factor insulin-2);
IGFBP:	Proteína de ligação do IGF (Insulin-like growth factor binding protein);
IL-1RI:	Receptor de interleucina 1 (Interleukin-1 receptor);
IL-1β:	Interleucina 1 β (Interleukin-1 β);
IL-6:	Interleucina 6 (Interleukin-6);
iNOS:	Óxido nítrico sintase induzível (Inducible nitric oxide synthase);
M:	Camada Molecular;

MAPK:	Proteína quinase ativada por mitógeno (Mitogen-activated protein kinases);
MAP:	Proteína ativada por mitógeno (Mitogen-activated protein);
MD 2:	Proteína mielóide de diferenciação 2 (Myeloid differentiation protein 2);
ML:	Médio-lateral;
NF-kB:	Fator nuclear Kappa B (Nuclear fator Kappa B);
NGF:	Fator de crescimento nervoso (Nerve growth fator);
NK:	Natural Killer;
NMDA:	N-metil D-aspartato (N-methyl-D-aspartate);
NO:	Óxido nítrico;
Nrf2:	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2);
Omi/HtrA2:	Serina protease mitocondrial, responsável por antagonizar as IAPs;
p53:	Proteína p53(Protein p53);
PCR:	Reação em cadeia da Polimerase (Polymerase chain reaction);
PI3k:	Fosfoinositol-3-quinase (Phosphoinositide 3 kinase);
PKA:	Proteína quinase A (Protein kinase A);
PKC:	Proteína quinase C (Protein kinase C);
RNA:	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid);
RT- PCR:	Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (Real-time polymerase chain reaction);
rTNF:	Receptor do fator de necrose tumoral (Tumor necrosis fator receptor);
SER:	Retículo endoplasmático liso (Smooth endoplasmic reticulum);
Smac/DIABLO	Segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria/ Proteína de ligação direta ao IAP com baixo pI (Second mitocôndria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI);
SNC:	Sistema Nervoso Central (Central nervous system);
TEM:	Microscopia eletrônica de transmissão (Transmission electronic microscopy);
TLR:	Receptor semelhante ao Toll (Toll like Receptor);
TLR4:	Receptor semelhante ao Toll 4 (Toll like Receptor 4);

TNF:	Fator de necrose tumoral (Tumor Necrosis Factor);
TNF-α:	Fator de necrose tumoral α (Tumor Necrosis Factor α);
TNFR-1:	Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1(Tumor necrosis factor receptor 1);
TRAIL:	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (Tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand);
UBA:	Domínio associado a ubiquitina (Ubiquitin-associated domains);
UChA:	Linhagens de ratos consumidores voluntários de etanol originários de colônias de animais provenientes da Universidade do Chile (UCh);
XIAP:	IAP ligada ao cromossomo X (X chromosome linked IAP);

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Alcoolismo.....	16
1.2 Alcoolismo e o encéfalo.....	17
1.3 Cerebelo.....	19
1.3.1 Anatomia macroscópica do cerebelo.....	19
1.3.2 Histologia do cerebelo.....	21
1.3.3 Conexões cerebelares.....	22
1.3.4 Conexões cerebelares extrínscas e organização morfofuncional.....	23
1.3.5 Considerações funcionais.....	24
1.4 Cerebelo e etanol.....	25
1.5 Mecanismos da apoptose.....	29
1.6 Proteínas envolvidas na cascata da apoptose e diferenciação celular.....	32
2 JUSTIFICATIVA.....	38
3 OBJETIVOS.....	39
4 CAPÍTULO 1: APOPTOSE DAS CÉLULAS DE PURKINJE E GRANULARES DO CEREBELO DECORRENTE DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL.....	40
5 CAPÍTULO 2: APOPTOSIS OF PURKINJE AND GRANULAR CELLS OF THE CEREBELLUM FOLLOWING CHRONIC ETHANOL INTAKE.....	72

6 CONCLUSÕES.....	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alcoolismo

Consumir etanol de forma indiscriminada é um dos principais riscos à saúde, sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade (WHO, 2014). O alcoolismo é uma síndrome multifatorial, com comprometimento físico, mental e social (EDWARDS; GROSS, 1976; EDWARDS et al., 1976).

O etanol acarreta sensação inicial de euforia seguida de sonolência e mal-estar. Age como depressor do Sistema Nervoso Central (SNC), com efeitos ansiolíticos e sedativos, retardando o tempo de reação e produzindo descoordenação motora. A sintomatologia do consumo de álcool pode ser identificada com náuseas, vômitos, cefaleia, polidipsia e fadiga. Em doses elevadas, induz a perda de consciência, hipoglicemia e coma (TURCATEL; FUNCHAL; GOMEZ, 2012). Cerca de 10% das populações dos centros urbanos de todo o mundo consomem abusivamente substâncias psicoativas, independentemente da idade, sexo, nível de instrução e poder aquisitivo. O uso indevido de etanol cresce de forma preocupante em países em desenvolvimento e traz graves consequências à saúde pública mundial, sendo um dos fatores de risco de maior impacto para a morbidade, mortalidade e incapacidade em todo o mundo, e parece estar relacionado a 3,3 milhões de mortes a cada ano. (REHM, 2011; WHO, 2014). Estudo conduzido pela Universidade de Harvard e instituições colaboradoras (MURRAY; LOPEZ, 1996; WHO, 2014) mostram a carga global de doenças que são parcialmente ou totalmente causadas pelo consumo abusivo do etanol, tais como: transtornos físicos, doenças infecciosas, cânceres, diabetes, desordens neuropsiquiátricas, cardiovasculares, hepáticas (cirrose), pancreáticas e acidentes (WHO, 2014).

O consumo de etanol impõe às sociedades agravos indesejáveis e extremamente dispendiosos, de forma direta e indireta, potencializando os custos em hospitais e outros dispositivos do sistema de saúde, sistema judiciário, previdenciário, perda de produtividade do trabalho, absenteísmo e desemprego. O histórico do papel nocivo do etanol deu origem à extensa resposta política, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias de prevenção eficazes para reduzir a dor, o sofrimento e os custos associados ao alcoolismo (REHM, 2011, WHO, 2014).

1.2 Alcoolismo e o encéfalo

O consumo abusivo do etanol provoca alterações na estrutura e funções do cérebro e, em alguns casos, pode levar a neurodegeneração. Alterações cognitivas e dependência são consequências graves do uso do etanol de forma indiscriminada. Resultados clínicos e experimentais têm demonstrado que o desenvolvimento do cérebro é particularmente vulnerável ao etanol, sendo que a ingestão de bebidas alcoólicas durante a gestação pode desencadear uma variedade de disfunções de aprendizagem, físicas e comportamentais, acentuadas na síndrome alcoólica fetal (ALFONSO-LOECHES; GUERRI, 2011).

Os mecanismos de atuação do etanol sobre o cérebro são complexos e com várias vias de sinalização. Alguns são comuns ao cérebro adulto e em crescimento, enquanto outros dependem do estágio de desenvolvimento. Durante a ontogênese do cérebro, o etanol provoca alterações irreversíveis em sua estrutura, lesando populações específicas de neurônios cerebrais, localizadas no córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo, substância branca e células da glia. Além disso, o etanol ocasiona prejuízos a vários eventos moleculares, neuroquímicos e celulares que ocorrem no desenvolvimento normal, alterando proteínas específicas da membrana, como: receptores para neurotransmissores (N-metil D-aspartato (NMDA), ácido gama-aminobutírico (GABA_A)), canais de íons (canais de Ca²⁺ do tipo-L, Proteína G ativa do canal de Potássio-GIRKs) e vias de sinalização (Proteína Quinase A (PKA) e Proteína Quinase C (PKC)), levando a desregulação da expressão gênica, alteração dos fatores de crescimento celular, favorecendo o aumento de radicais livres e acarretando desarranjos de funções das células da glia. No entanto, independente da idade (adulto ou adolescente), os danos do etanol ocorrem em áreas específicas do cérebro, por meio de mecanismo que envolve a excitotoxicidade, formação de radicais livres e danos neuroinflamatórios, sendo um dos seus mecanismos a ativação do sistema imune inato mediado por receptores TLR4 (*Toll-like receptors 4*) (ALFONSO-LOECHES; GUERRI, 2011) (Figura 1).

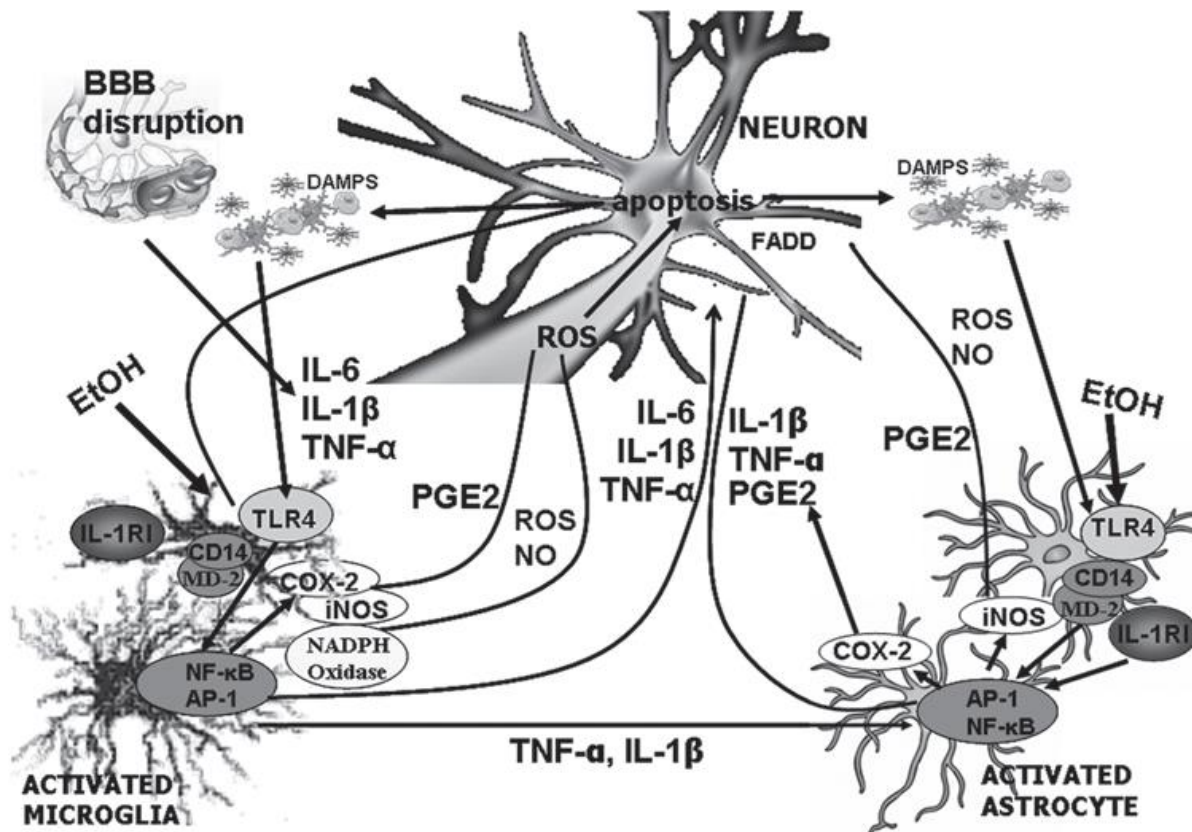


Figura 1. Componentes neuroinflamatórios do dano cerebral induzido por etanol. O etanol, através da ativação dos receptores Toll like 4 (*TLR4 – Toll –like receptor 4*) e interleucina-1 (*IL-1RI – interleukin-1 receptor*), estimula as células microgliais e astrócitos, que desencadeiam as vias de sinalização (*MAPK (Mitogen-activated protein kinases)*), o *NF-κB (Nuclear fator Kappa B)* e *AP-1 (Activator protein-1)* e a produção de mediadores pró-inflamatórios (*iNOS (Inducible nitric oxide synthase)* e *COX-2(Cyclooxygenase-2)*), citocinas (*IL-6 (Interleukin-6)*), *IL-1β (Interleukin-1 β)* e *TNF-α (Tumor Necrosis Factor α)*), espécies reativas de oxigênio (*EROS*) e óxido nítrico (*NO*), que conduzem a danos neuroinflamatórios. Os produtos derivados da microglia e astrócitos atuam em combinação para promover a neurotoxicidade e favorecer a morte celular. Estes eventos inflamatórios podem também aumentar a lesão da célula através da ativação de receptores TRL4, por ligantes TLR endógenos (por exemplo, *DAMPs (Damage-associated molecular pattern molecules)* - incluindo o dendrito celular) permitindo uma amplificação da resposta inflamatória induzida por etanol de modo cíclico. Barreira hemato-encefálica (ALFONSO-LOECHES; GUERRI, 2011).

As mudanças desencadeadas pelo etanol em circuitos neurais agem nos processos motivacionais, incluindo a excitação, o sistema de recompensa e o estresse do organismo. Essas mudanças afetam diferentes sistemas neurotransmissores, como: gabaérgico, glutamatérgico, opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e colinérgico (GILPIN; KOOB, 2008). O sistema neurotransmissor gabaérgico se relaciona aos efeitos depressores do SNC, uma vez que o etanol, por possuir alta afinidade pelos receptores $GABA_A$, presentes em mais de 20% dos neurônios cerebrais, favorecem suas conexões sinápticas (GILPIN; KOOB, 2008).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Atua através de vários subtipos de receptores, incluindo o NMDA com efeitos ambíguos. Inicialmente, seu consumo agudo aumenta liberação do neurotransmissor glutamato no hipocampo, levando a excitação característica de alcoólicos. O aumento da dose favorece aos efeitos antagonistas do etanol sobre os receptores NMDA, gerando sintomatologia de sonolência e depressão. Após a ingestão crônica de etanol, ocorre aumento de receptores NMDA no encéfalo, contribuindo para geração de crises de abstinência com hiperexcitabilidade do SNC, refletindo no aumento da agressividade observada em animais e em humanos (GASS; OLIVE, 2008; TURCATEL; FUNCHAL; GOMEZ, 2012).

Nos receptores opióides, o etanol age como agonista, sendo o principal responsável pelo reforço positivo com dependência, fissura e sinais de abstinência (ROBERTS et al., 2000; TURCATEL; FUNCHAL; GOMEZ, 2012).

Os efeitos do etanol sobre o sistema serotoninérgico envolvem as alterações dos níveis de serotonina no encéfalo, refletindo em agressividade e impulsividade. Além disso, o etanol afeta o sistema dopaminérgico via mesolímbica, responsável pela dependência. Todos os sistemas neurotransmissores descritos contribuem para alterações de comportamento associadas ao consumo de álcool por seres humanos e animais. Compreender as redes neurais alteradas pelo etanol favorece o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para o alcoolismo (GILPIN; KOOB, 2008; TURCATEL; FUNCHAL; GOMEZ, 2012).

1.3 Cerebelo

1.3.1 Anatomia macroscópica do cerebelo

O cerebelo é originário da parte dorsal do metencéfalo e situa-se dorsalmente ao bulbo e a ponte, contribuindo para formação do teto do IV ventrículo. Repousa sobre a fossa cerebelar do osso occipital, comunica-se à medula e ao bulbo pelo pedúnculo cerebelar inferior, à ponte e ao mesencéfalo pelos pedúnculos cerebelares médios e superiores. Anatomicamente, distingue-se no cerebelo uma porção ímpar e mediana, o vermis, ligado a duas grandes porções laterais, os hemisférios cerebelares. Sua superfície apresenta sulcos de direção predominantemente transversais que delimitam lâminas finas denominadas folhas do cerebelo. Existem também

sulcos mais pronunciados, as fissuras do cerebelo, delimitando lóbulos, podendo conter várias folhas (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003; COSENZA, 2005).

De acordo com Larsell (1970), o cerebelo de todo mamífero pode ser dividido em dez lóbulos básicos, numerados com algarismos romanos de I a X, da região anterior para posterior, adicionalmente subdivididos em lóbulos secundários e terciários. A proposta baseia-se principalmente na ontogênese do órgão e leva em consideração o fato de que a primeira fissura a aparecer durante o desenvolvimento do cerebelo é a póstero-lateral, dividindo-o em duas partes desiguais: o lóbulo flóculo-nodular e o corpo do cerebelo. Seguido do surgimento da fissura prima que separa o corpo do cerebelo em lobos anterior e posterior (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003; COSENZA, 2005).

Outra forma de divisão cerebelar é a filogenética, cuja compreensão exige o conhecimento de alguns aspectos da filogênese do órgão, sendo reconhecidas três divisões, correlacionadas à complexidade dos movimentos realizados pelo grupo de vertebrados característicos de cada fase (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003):

- Arquicerebelo: consiste no lóbulo flóculo-nodular junto à região adjacente do vermis inferior (úvula), presente nos peixes e anfíbios inferiores, corresponde ao cerebelo vestibular (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003);
- Paleocerebelo: representado pelo lobo anterior e pelo vermis inferior no lobo posterior (úvula e pirâmide). Encontra-se em anfíbios superiores e apresenta-se maior em répteis e aves, corresponde ao cerebelo espinhal. (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003);
- Neocerebelo: formado pelos hemisférios cerebelares juntamente com o vermis superior do lobo posterior, presente em mamíferos e maior em humanos, corresponde ao cerebelo cortical. (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003);

Nos mamíferos, a porção medial do cerebelo (vermis) possui padrão de foliação ao longo do eixo ântero-posterior (AP) distinta das extensões laterais (hemisférios), com a zona intermediária separando-os (zona paravermal). Lateralmente, estão o flóculo e nódulo, estendendo-se da porção ventral do cerebelo posterior, com foliação diferente das demais regiões. A referência morfológica pode ser usada para dividir o cerebelo no eixo médio-lateral (ML) em quatro regiões distintas molecularmente, funcionalmente e com padrão de terminações aferentes (CHOCKKAN; HAWKER, 1994; HALLEM et al., 1999). Anatômica e fisiologicamente, o

cerebelo adulto é funcionalmente compartimentalizado dentro de grupos ao longo do eixo ML. Esses agrupamentos aparecem como estrutura básica, na qual as funções cerebelares são executadas (HASHIMOTO; MIKOSHIBA, 2003).

1.3.2 Histologia do cerebelo

O cerebelo está entre os órgãos mais complexos do sistema nervoso central dos mamíferos (LEE et al., 2001). Constituído de centro de substância branca, corpo medular do cerebelo, composto de núcleos cerebelares, de onde irradiam lâminas brancas revestidas externamente por fina camada de substância cinzenta, o córtex cerebelar (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003), formado principalmente por dois tipos de neurônios: as células granulares e de Purkinje (ALTMAN, 1972 a,b,c; VOOGD; GLICKSTEIN, 1998). O córtex cerebelar é histologicamente homogêneo e possui citoarquitetura caracterizada por três estratos: molecular, purkinjense e granuloso (VOOGD, 2003) (Figura 2 a-c).

O estrato molecular é superficial, constituído de fibras em direção paralela, células estreladas e em cesto. Apresentam sinapses axossomáticas em torno do corpo das células de Purkinje (VOOGD; GLICKSTEIN, 1998; MACHADO, 2002).

O estrato purkinjense representa o elemento dominante no processo de informação cerebelar (APFEL, 2002). As células de Purkinje são piriformes e grandes, dotadas de dendritos que se ramificam na camada molecular e axônio em direção oposta, terminando nos núcleos centrais do cerebelo, mediante ação inibitória (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003).

O estrato granuloso é formado por células granulares ou grânulos do cerebelo, neurônios pequenos com citoplasma reduzido e numerosos (Figura 2a-c). Têm vários dendritos e um axônio que, ao atingir a camada molecular, bifurca-se em T originando as fibras paralelas que estabelecem sinapses com os dendritos das células de Purkinje. Ademais, na camada granular identificam-se as células de Golgi. (MACHADO, 2002).

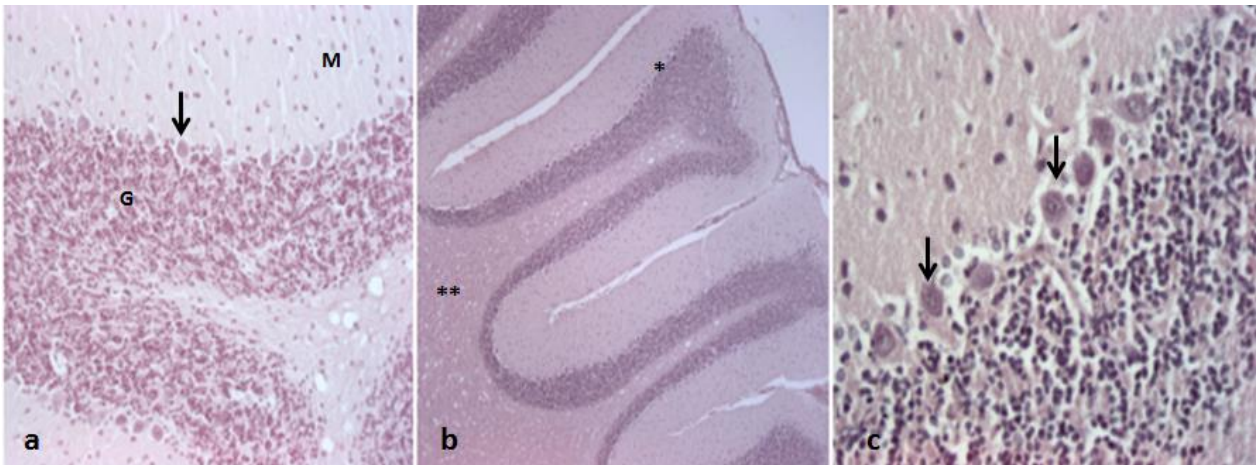


Figura 2. a-c. Fotomicrografias do cerebelo do rato. H.E. a. Observar estratos molecular (M), purkinjense (seta) e granular (G), note grande número de neurônios que compõem a camada granular (G) 20X. b. Córtex cerebelar (*) e corpo medular do cerebelo (**) 5X. c. Células de Purkinje (setas) 40X (OLIVEIRA et al., 2014).

1.3.3 Conexões cerebelares

Três classes de projeções aferentes do cerebelo emitem sinais para todos os lóbulos. A primeira classe são as fibras musgosas, originadas de regiões do encéfalo e medula espinhal. Seus axônios são enviados ao cerebelo dos núcleos pontino, vestibular e todos os segmentos da medula espinhal. A segunda classe de conexões aferentes são as fibras trepadeiras do complexo olivar inferior, com terminações nervosas na camada molecular interagindo junto às células de Purkinje. A última classe inclui as aferentes noradrenérgicas do *locus ceruleus*, as colinérgicas dos núcleos pedúnculo-pontino e as serotoninérgicas dos núcleos da *raphe*. Situam-se nos estratos do córtex cerebelar e possuem organização semelhante médio-lateral (MACHADO, 2002; SILLIOTOE; JOYNER, 2007).

As musgosas, ao penetrarem no órgão, emitem ramos colaterais que fazem sinapses excitatórias com os neurônios dos núcleos cerebelares. No estrato granuloso, se ramificam terminando em sinapses excitadoras axodendríticas com grande número de células granulares que, através das fibras paralelas, se ligam às células de Purkinje e constituem o circuito cerebelar básico. As células de Purkinje, de Golgi, estreladas e as “em cesto”, possuem ação inibitória e atuam pela liberação do ácido gama-aminobutírico (GABA). As células granulares, únicas com função excitatória do córtex cerebelar, tem como neurotransmissor o glutamato (MACHADO, 2002).

Os núcleos cerebelares localizam-se na substância branca (MACHADO, 2002). O núcleo do fastígio fica próximo ao plano mediano em relação com o ponto mais alto do teto do IV ventrículo. O denteado é o maior dos núcleos centrais e se posiciona lateralmente. Entre esses dois, encontram-se os núcleos emboliforme e globoso, semelhantes do ponto de vista funcional e estrutural. A informação é processada grosseiramente nos núcleos centrais e aprimorada por impulsos recebidos do córtex (MACHADO, 2002; KIERNAN, 2003).

1.3.4 Conexões cerebelares extrínsecas e organização morfofuncional

O cerebelo recebe aferências dos núcleos vestibulares, medula espinhal, formação reticular, núcleos pontinos e do complexo olivar inferior (CONSENZA, 2005). Envia respostas por conexões eferentes que influenciam os neurônios motores da medula de forma indireta e atuam por intermediários de áreas do tronco encefálico, tálamo ou regiões motoras do córtex cerebral. As projeções eferentes do cerebelo são provenientes de três núcleos centrais que interagem com os axônios das células de Purkinje das três zonas longitudinais do corpo cerebelar (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003; CONSENZA, 2005).

O cerebelo vestibular ocupa-se basicamente da manutenção do equilíbrio corporal. Representado pelo lóbulo flóculo-nodular, recebe fibras originadas nos receptores do labirinto da orelha interna, informando a posição e os movimentos cefálicos. Essas aferências podem ser diretas ou indiretas ao cerebelo com sinapse nos núcleos vestibulares. O córtex do lóbulo flóculo-nodular processa as informações e comunica-se aos núcleos vestibulares através do axônio das células de Purkinje. Origina o tracto vestibulo-espinhal, que influencia os neurônios motores da medula, porção medial, e atua sobre a musculatura proximal. Os núcleos vestibulares formam fibras que participam do mecanismo de controle dos movimentos oculares pelo fascículo longitudinal medial (KEIRNAN, 2003; CONSENZA, 2005).

O cerebelo espinhal supervisiona a manutenção do tônus muscular, necessário à permanência da postura corporal. Recebe informações do corpo em função da medula, através dos tractos espinocerebelares anterior e posterior, que se dirigem ao córtex do lobo anterior e porções do vermis do lobo posterior do cerebelo. Após processamento das informações, o córtex cerebelar comunica-se aos núcleos do fastígio, emboliforme e globoso. Emitem conexões para o

tronco encefálico: o núcleo do fastígio para os núcleos vestibulares e formação reticular, os núcleos emboliforme e globoso para o núcleo rubro (KEIRNAN, 2003; CONSENZA, 2005).

O cerebelo cortical é importante na coordenação e planejamento da motricidade. Regiões do córtex cerebral enviam fibras aos núcleos pontinos através do tracto cortico-pontino, associado às áreas ligadas aos processamentos sensoriais ou regiões de associação, córtex pré-frontal. Os núcleos pontinos fazem sinapses com porções laterais do córtex cerebelar. A informação é processada e encaminhada aos núcleos denteados, que se ligam ao tálamo e emitem fibras para áreas do córtex cerebral com funções motoras e, também, em porções que deram início ao circuito. O circuito cortico-ponto-cerebelo-tálamo-cortical influencia o córtex cerebral, porção motora, que origina o tracto córtico-espinhal responsável pelos movimentos voluntários e atua na porção muscular distal (KEIRNAN, 2003; CONSENZA, 2005).

1.3.5 Considerações funcionais

O cerebelo é coordenador da motricidade, compara as ordens emanadas dos centros superiores e os movimentos executados, providenciando que sejam suaves, harmônicos e eficazes (COSENZA, 2005). Regula o movimento e o equilíbrio, ajusta informações e recebe aferências dos sistemas motores descendentes do cérebro (GHEZ, 2001). A manutenção do equilíbrio e da postura ocorre basicamente pelo arquicerebelo e zona medial (vermis). O controle dos movimentos voluntários envolve duas etapas: planejamento do movimento, elaborada na zona lateral do órgão por informações trazidas via cortico-ponto-cerebelar e outra de correção do movimento, de responsabilidade da zona intermédia do cerebelo, a qual compara as características do movimento em execução ao plano motor e promove correções via interpósito – tálamo – cortical (MACHADO, 2002). Lesões, nessa região, provocam distúrbios da coordenação nos movimentos dos membros (ataxia) e olhos (nistagmo), decomposição dos movimentos, déficit de equilíbrio e redução de tônus muscular, acarretando hipotonia (GHEZ, 2001; COSENZA, 2005).

A integração da atividade motora do cerebelo inclui o controle da linguagem, uma vez que está ligado à iniciação, planejamento e ritmos dos movimentos musculares voluntários dos órgãos fonoarticulatórios e alterações neurais resultam em disartria (SCHMAHMANN, 1991).

O aprendizado motor ocorre por fibras olivo-cerebelares, trepadeiras, que fazem sinapses com as células de Purkinje (MACHADO, 2002). Possui papel importante na aquisição da memória de procedimentos, controle visceral, processos sensoriais, de atenção, linguagem e de outros sistemas comportamentais. No entanto, sua forma de atuação não está evidente. Especula-se que sua função seria comparar e preparar o sistema nervoso para aquisição e análise de informações, além da ação propriamente dita. Atuaria como um sistema computacional, capaz de detectar, prevenir e corrigir erros, nos processos motores ou cognitivos (COSENZA, 2005).

O cerebelo, não obstante constitua apenas 10% do volume total do encéfalo, contém mais da metade de todos os neurônios do sistema nervoso central (GHEZ, 2001). Estudos apontam sua participação na cognição, desenvolvimento e alterações psiquiátricas (RAPOPORT; VAN REEKUM; MAYBERG, 2000), possuindo conexões via tálamo para áreas encefálicas relevantes a esses processos (MIDDLETON; STRICK, 1997; DOLAN, 1998).

1.4 Cerebelo e etanol

Análises neuropatológicas revelaram alterações do cerebelo em doenças cognitivas e comportamentais. Além disso, o etanol, por décadas, foi avaliado no cerebelo em decorrência das alterações de coordenação motora acarretadas por seu consumo (BUGALHO; CORREA; VIANA-BAPTISTA, 2006).

O conceito de rede neuronal propõe que áreas distantes do cérebro possam participar de diversas formas, através de vias e circuitos próprios, do controle de funções cognitivas, contribuindo com elementos específicos para um resultado comportamental, que é efeito da combinação de várias operações. Nesse contexto, o cerebelo também atua junto à orientação visuoespacial, à linguagem e ao comportamento afetivo, sendo as investigações sobre sua ação nessas atividades um dos maiores desafios da neurociência. O papel do cerebelo no comportamento afetivo foi evidenciado por trabalhos que mostraram pacientes com lesões cerebelares apresentando distúrbios afetivos como: desinibição, impulsividade, comentários inapropriados ou infantilização. Subsequentemente, déficits comportamentais e emocionais têm sido descritos em pacientes com dano cerebelar congênito ou adquirido: apatia, indiferença, transtornos obsessivo-compulsivos, traços de psicose, comportamento agressivo e síndrome do

pânico. Têm-se demonstrado vias bidirecionais que ligam o cerebelo às regiões envolvidas na regulação emocional, ou seja, o sistema reticular (excitação), áreas corticais de associação (processamento cognitivo de emoções) e estruturas límbicas (BUGALHO; CORREA; VIANA-BAPTISTA, 2006; DE SMET et al., 2010).

Devido ao seu papel predominante na motricidade, o envolvimento do cerebelo na modulação cognitiva e afetiva foi negligenciado. A função do cerebelo na neurocognição ainda não está elucidada, não se conhecendo a natureza exata do mecanismo cerebelar (DE SMET et al., 2010). Dessa forma, o estudo do impacto do etanol sobre o cerebelo deve buscar elucidar não só alterações de coordenação já conhecidas, como também os problemas afetivos, de linguagem, memória e comportamentais. O etanol é uma neurotoxina que altera as propriedades físico-químicas das membranas plasmáticas, afetando a embriogênese, a migração e a diferenciação celular. A exposição pré-natal à droga afeta o desenvolvimento de quase todos os órgãos. Entretanto, o encéfalo é mais suscetível à toxicidade pelo etanol, lesando componentes celulares cruciais ao desenvolvimento cerebral, manifestado depois de longo tempo na prole por: más formações craniofaciais, alterações na morfologia e função do SNC (SILVA et al., 2006; BAILEY; SOKOL, 2008; GUERRI; BAZINET; RILEY, 2009).

Os neurônios de Purkinje e granulares do cerebelo sofrem apoptose em resposta à exposição crônica ao etanol (IKONOMIDOU; KAINDL, 2011), esta se reflete em atrofia difusa do córtex cerebelar (OLIVEIRA et al., 2014a) ou de porções específicas, como a região anterossuperior do vermis (VICTOR; ADAMS; MANCALL, 1959; PHILLIPS; HARPER; KRIL, 1987; TORVIK; TORP, 1986). Além desta região, o lóbulo flóculo-nodular e a substância branca mostram diminuição do volume em humanos alcoólicos (VICTOR; ADAMS; MANCALL, 1959; BAKER et al., 1999). A principal característica neuropatológica que contribui para a atrofia cerebelar é a perda e/ou atrofia das células de Purkinje (ALLSOP; TURNER, 1966; PHILLIPS; HARPER; KRIL, 1987; KARHUNEN; ERKINJUNTTI, 1994; ANDERSEN, 2004).

A exposição pré-natal ao etanol diminui o volume cerebral. Todavia, no cerebelo, onde esta redução é mais intensa, ocorre a degeneração das funções cognitivas e comportamentais (DE SMET et al., 2010). Ao longo de seu desenvolvimento, o cerebelo mostra-se extremamente vulnerável ao consumo de etanol em grandes quantidades, o que ocasiona prejuízos às células de Purkinje, granulares e da glia (MAIER; WEST, 2001; SAKATA-HAGA et al., 2001). Os

neurônios de Purkinje são os elementos dominantes do processamento de informações cerebelar (APFEL et al., 2002), os quais, assim como as células granulares, podem sofrer apoptose frente ao etanol (LUO, 2012; OLIVEIRA et al. 2014 a,b), desencadeando prejuízos a coordenação motora (ITO, 1984; SARNA; HAWKES, 2003; JAATINEN; RINTALA, 2008; LUO, 2012; HUANG et al., 2013).

O termo apoptose, sinônimo de morte celular programada, conceitua uma forma de morte celular distinta morfológicamente, associada à fisiologia normal. Está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica dos tecidos, mas pode também ser causada por um estímulo patológico (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; NOVAIS et al., 2012).

A apoptose ocorre no SNC durante o desenvolvimento normal, mas também pode ser induzida por doença ou após insultos exógenos. Dependendo da magnitude do estímulo, ela acontece de forma local ou difusa. Devido à estrutura altamente ordenada do sistema nervoso, as abordagens de detecção imunistoquímicas fornecem uma variedade de informações sobre a natureza espaço-temporal do processo apoptótico, permitindo a identificação de doenças e de populações celulares suscetíveis a apoptose (LEE; McKINNON, 2009).

Existe uma vasta literatura que mostra as lesões cerebelares decorrentes do consumo pós-natal de álcool, dos efeitos do consumo do álcool em ratas prenhas e durante a sinaptogênese (NAPPER; WEST, 1995; OLNEY et al., 2000; NOWOSLAWSKI; KLOCKE; ROTH, 2005; LUO, 2012), porém estudos do impacto do álcool sobre ratos adultos são menos frequentes. Acredita-se que tal ocorrência está relacionada ao fato de o cerebelo ser um dos órgãos mais suscetíveis às lesões provocadas pela presença do etanol durante o desenvolvimento, sofrendo apoptose de seus neurônios principais: Purkinje e granulares (LUO, 2012).

Ainda no âmbito experimental, a exposição ao etanol, mesmo que por curto período, pode causar apoptose de forma difusa no cérebro de roedores em desenvolvimento e acarretar déficits neurocognitivos permanentes. Tem sido proposto que estes déficits neurocomportamentais observados são decorrentes da síndrome fetal alcoólica (FASD) (FABER; CREELEY; OLNEY, 2010). Apesar de o cerebelo ser um dos órgãos mais suscetíveis ao etanol durante o desenvolvimento (LUO, 2012), em ratos adolescentes os neurônios de Purkinje mostraram-se menos suscetíveis aos efeitos do etanol que em animais adultos, onde o etanol leva à significativa diminuição da atividade de condução das células de Purkinje e consequente dano motor (VAN

SKIKE et al., 2010). O etanol também desencadeia alterações no metabolismo da glicose e predispõem a morte neuronal no cerebelo (FATTORETTI et al., 2003).

Doenças relacionadas com o etanol no sistema nervoso são causadas pela exposição excessiva ao etanol, com ou sem deficiências nutricionais. Os efeitos tóxicos e metabólicos do etanol variam de acordo com a região do cérebro, idade, estágio de desenvolvimento, dose e duração da exposição. No cérebro adulto o consumo crônico de etanol pode causar doenças debilitantes e graves do sistema nervoso central, periférico e do músculo esquelético. Mais comumente, o consumo de etanol crônico leva à perda de substância branca cerebral e deficiências na função executiva. O cerebelo (especialmente no vermis), o circuito córtico-límbico, o músculo esquelético e os nervos periféricos também são alvos importantes da lesão metabólica crônica relacionada ao álcool e consequente degeneração. Apesar de todos os tipos de células no sistema nervoso serem vulneráveis aos efeitos do etanol, os astrócitos, oligodendrócitos e terminais sinápticos sofrem neurodegeneração, levando a atrofia da substância branca, inflamação neural e toxicidade com prejuízos a sinaptogêneses. Além disso, a neuropatologia crônica degenerativa faz com que alcoólicos estejam mais predispostos a desenvolver lesões hemorrágicas agudas, potencialmente fatais no diencefalo e tronco cerebral, por deficiência de tiamina, que exerce efeitos tóxicos na glia, mielina e na microcirculação. O etanol também tem efeitos neurotóxicos e teratogênicos devastadores sobre o cérebro em desenvolvimento, em associação com a síndrome fetal alcoólica. Esta droga, da mesma forma, prejudica a função dos neurônios e células gliais, interrompendo uma ampla variedade de funções, incluindo a sobrevivência neuronal, migração celular, e diferenciação das células da glia (astrócitos e oligodendrócitos) (SUZANNE; KRIL, 2014).

Alcoólicos sofrem disfunções motoras discretas que se tornam mais acentuadas com a idade. Estes déficits envolvem a estrutura e função de neurônios de Purkinje, que apresentaram regressão dendrítica em animais adultos e no envelhecimento, após o consumo prolongado de etanol. Tal alteração é precedida por dilatação extensa do retículo endoplasmático liso (SER), sendo o componente do SER mais afetado pelo etanol a bomba Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), responsáveis pela fixação do cálcio no SER. Diminuições induzidas pelo etanol nos níveis da bomba SERCA se assemelham aos achados da dilatação do SER, o qual precede e ocorre concomitantemente com regressão dendrítica (DLUGOS, 2015).

Em humanos, a abstinência alcoólica leva a déficits específicos de conectividade funcional e recrutamento de regiões adicionais do cérebro, necessárias para o desempenho de tarefas simples. Esse padrão funcional fronto-cerebelar diminuído é altamente compatível com as lesões neuropatológicas documentadas em alcoolistas e pode refletir na disfunção cerebral associada com alcoolismo (ROGERS et al., 2012).

Pesquisas que envolvem substâncias neuroprotetoras também vêm sendo realizadas, porém mais comumente em associação com o desenvolvimento cerebelar. A taurina mostra-se como um neuroprotetor da apoptose decorrente da ação do etanol no cerebelo com padrão distinto de atuação, sendo mais efetiva para as células granulares do que aos neurônios de Purkinje (TARANUKHIN et al., 2010).

Assim, avalia-se o etanol como lesivo ao cerebelo de animais e do homem, nas diferentes idades e em diferentes formas de exposição. Pesquisas mostram o impacto do etanol no cerebelo, sendo a apoptose o principal mecanismo de morte celular decorrente do consumo desta droga (IDRUS et al., 2011; VAN SKIKE et al., 2010; LUO 2012; ROGERS et al., 2012; ZEEUW et al., 2012; OLIVEIRA et al. 2014b). Todavia, ainda serão necessários maiores estudos que evidenciem os mecanismos de ação do etanol na lesão cerebelar e os déficits funcionais decorrentes do consumo desta substância em animais, bem como nos seres humanos.

1.5 Mecanismo da apoptose

O ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico sofre ameaças frequentes, mesmo em células saudáveis. Os danos podem decorrer de espécies reativas do oxigênio, erros estocásticos na duplicação ou recombinação do DNA, bem como de genotoxinas ambientais ou terapêuticas. Os organismos multicelulares têm a possibilidade de eliminar as células danificadas por meio da ativação de mecanismos de morte celular programada (NORBURY; ZHIVOTOVSKY, 2004; CARMINATI et al., 2010). A apoptose pode ser compreendida como um tipo de auto-destruição celular que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução. Está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica dos tecidos (LOPES, 2009; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Pode ser reconhecida por características morfológicas marcantes e coordenadas como: condensação da cromatina, que se concentra junto à membrana

nuclear, prolongamentos da membrana celular, presença de porções celulares com fragmentos nucleares denominados corpos apoptóticos que, por sua vez, são fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; NOVAIS et al., 2012).

Diversos genes regulam a apoptose, dentre eles estão as famílias: caspases (*Cysteine-proteinase-aspártic-ase*), Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*), IAPs (*Inhibitor of apoptosis proteins*) e TNF (*Tumor Necrosis Factor*). As caspases são cisteínas proteases que pertencem a uma grande família de proteínas com atividades enzimáticas. Estas são proteínas homólogas entre si, com 14 membros bem caracterizados nos mamíferos, dos quais 11 no ser humano. As caspases são divididas em duas classes, as iniciadoras e as efetoras. As caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidos na iniciação da cascata proteolítica. Já as efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos. A ativação das caspases efetoras (como as caspases 3 e 7) é desempenhada por caspases iniciadoras (como a caspase 9), através da clivagem de resíduos específicos de ácido aspártico interno, que se separam em subunidades pequenas e grandes. As caspases iniciadoras, entretanto, são autoativadas e inevitavelmente desencadeiam uma cascata de ativação de caspases rigidamente regulada (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; NOVAIS et al., 2012).

A família Bcl-2 é composta por proteínas indutoras e repressoras da morte celular apoptótica participando ativamente da regulação deste processo. Entre elas, Bcl-2 e Bcl-x1 (*Bcl-2 related gene, long isoform*) inibem a apoptose, uma vez que previnem a liberação de citocromo *c* e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Já, Bax (*Bcl-2 associated X protein*), Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) e Bak (*Bcl2- antagonist killer 1*) são proteínas pró-apoptóticas. A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

As IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) são proteínas que atuam como inibidoras de apoptose e exercem seu papel antiapoptótico através da capacidade de inibirem a atividade das caspases efetoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9 e de modularem o fator de transcrição NF-κB

(*Nuclear factor Kappa B*). As IAPs foram primeiramente isoladas do genoma de baculovírus. Durante a apoptose, as IAPs são removidas por uma proteína liberada da mitocôndria denominada Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI*). Após o dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo *c*. Enquanto o citocromo *c* liga-se à APAF-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO, remove as IAPs de sua ligação inibitória com as caspases (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A superfamília dos receptores fatores de necrose tumoral (rTNF) é composta por diversos membros: TNFR-1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*), Fas/CD95 (*Fas receptor*), TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), os quais possuem como principal característica um domínio extracelular rico em cisteína. Dentre eles, os receptores do Fas (*Fatty acid synthetase*) e do TNF são os dois receptores de morte mais bem caracterizados, da superfamília TNF/NGF (NGF- *Nerve growth factor*). A ativação do Fas pelo seu ligante (FasL - *Fas ligand*) está envolvido no mecanismo de ativação de células T citotóxicas e de células NK (*Natural killer*) contra células cancerosas e infectadas por vírus (KUSHLINSKII et al., 2002).

A resposta apoptótica é mediada através de duas vias: extrínseca e intrínseca, dependendo da origem do estímulo para morte celular. A via intrínseca (mitocondrial) é desencadeada em resposta a amplas mudanças nos estímulos de morte que são geradas no interior da célula, enquanto a via extrínseca (de receptores de morte) é iniciada pela junção de ligantes de morte extracelulares à receptores de morte da superfície celular (NOVAIS et al., 2012).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria. Esta, por sua vez integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial com consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes, perda do homeostasia celular, com interrupção da síntese da adenosina trifosfato (ATP) e aumento nos níveis de EROS, que por sua vez levam a oxidação de lipídios, proteínas e ácido nucléicos. Os diferentes sinais indutores de apoptose detectados pela mitocôndria, fazem com que ocorra a liberação de citocromo *c* e de proteínas ativadoras da apoptose para o citosol. No citosol, o citocromo *c* forma um complexo

com a APAF- 1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A via extrínseca da apoptose é iniciada por ação extracelular de mensageiros, denominados ligantes de morte. Estes se ligam aos receptores de superfície da célula chamados de receptores de morte, que ativam o sinal intracelular de eventos que iniciam a cascata apoptótica (REED, 2000). Os receptores do Fas e do TNF possuem ligantes correlatos FasL e o TNF. O Fas liga três moléculas de Fas resultando em um trímero, formando um grupo de domínio de morte que associa-se com uma proteína adaptadora chamada FADD (*FAS-associated death domain*) que então se liga através de seu próprio domínio de morte. O FADD contém um segundo domínio chamado de DED (*Death effector domain*), responsável pelo recrutamento da pró-caspase 8 através dos domínios DED presentes em sua proenzima. A pró-caspase 8 sofre clivagem própria e ativação, seguindo oligômeros no complexo protéico Fas-associado. Isto por sua vez ativa os efetores de caspases, levando a célula à apoptose (WHITE; MCCUBREY, 2001, GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; LIZARTE NETO, et al. 2013).

1.6 Proteínas envolvidas na cascata da apoptose e na diferenciação celular

Dentre as diversas moléculas que atuam na cascata de eventos apoptóticos, algumas merecem destaque por seu papel primordial. Independente da via que conduza a apoptose, quer seja via extrínseca ou via intrínseca, ambas culminam com a clivagem e ativação da pró-caspase-3. A caspase 3 está presente no citosol e no espaço intermembrana mitocondrial na sua forma inativa, como pró-caspase 3, a qual possui 32 KDa (também designada de *CPP32/ Yamal/ Apopain*) sofrendo processamento proteolítico em resíduos conservados aspárticos para produzir duas subunidades, grandes e pequenas (20KDa e 17 KDa), que dimerizam para formar a enzima ativa. Essas proteases são caracterizadas pela especificidade quase em absoluto para o ácido aspártico na posição P1, sendo que elas contêm conservado o local ativo do pentapeptídeo QACXG (onde X é R, Q ou G) (COHEN, 1997).

As enzimas ativas funcionam como tetrâmeros formados por dois heterodímeros de subunidades pequenas e dois de subunidades grandes (17-20). Os heterodímeros contêm um local ativo composto por resíduos de ambas as subunidades pequenas e grandes. Cada sítio ativo

contém um subsítio S1 carregado positivamente o qual se liga ao subsítio P1 do substrato aspartato carregado negativamente. Esse local de ligação S1 é altamente conservado. Portanto, todas as caspases clivam-se unicamente após o resíduo aspartato (COHEN, 1997).

Na execução da cascata apoptótica, a caspase-3 é responsável pela proteólise de substratos que contenham: Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) (COHEN, 1997). A existência da extensão Asp nos sítios de manutenção da clivagem, conferem as caspases a habilidade de se auto-clivar ou de serem clivadas pelas outras caspases, visando à amplificação da cascata apoptótica (ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001).

Na ativação da cascata das caspases, a degradação de DNA ocorre em primeiro lugar nas regiões ricas em A/T produzindo-se assim, fragmentos de 50 – 200 Kb. A CAD (*Caspase activated DNase*) é armazenada pelo seu inibidor ICAD (*Inhibitor of CAD*), o qual é inativado quando clivado pela caspase-3 (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). A degradação de DNA nas células apoptóticas é de responsabilidade da CAD. (DANIAL; KORSMEYER, 2004).

A apoptose de forma descontrolada é responsável por diversas patologias humanas, incluindo doenças neurodegenerativas, tais como: Alzheimer e doença de Huntington, lesões cerebrais isquêmicas, doenças auto-imunes e vários tipos de cânceres (COHEN, 1997). Sendo a ativação da caspase 3 a via final para morte celular apoptótica, esta tem sido extensivamente estudada em diferentes órgãos alvos e com várias formas de tratamentos.

No cerebelo de ratos adultos, ocorre aumento de marcação de caspase-3 frente ao consumo crônico de etanol (OLIVEIRA et al., 2014b). A caspase 3 também mostra-se aumentada em fetos, com idade gestacional de 21 dias, de ratas prenhas expostas ao chumbo nas primeiras duas semanas de concepção. A exposição ao chumbo prejudica o desenvolvimento das camadas cerebelares, induz mudanças estruturais e a apoptose no córtex cerebelar fetal, a qual é evidenciada pelo aumento da caspase 3 (MOUSA et al., 2014). Já na esquizofrenia crônica, há redução do volume de substância cinzenta cortical, onde a apoptose é um dos mecanismos fisiológicos utilizados para explicar os achados desta patologia. A relação aumentada nos níveis Bax / Bcl-2 sugere que as células corticais são vulneráveis a morte celular programada. No entanto, o nível de caspase-3 normal, evidenciou que a apoptose não está ativa nesta fase da esquizofrenia. Além disso, os resultados parecem distinguir a fisiopatologia da esquizofrenia da maioria das doenças neurodegenerativas clássicas, em que *post-mortem* os níveis de caspase-3 são elevados (JARSKOG et al., 2014). Na Doença de Alzheimer a caspase 3 é um modulador

endógeno da produção de GSAP (*Gamma-secretase activating protein*) e da biogênese do peptídeo beta-amilóide (CHU et al., 2014). Além disso, a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007), sendo que a expressão de caspase-3 encontra-se menor que a de Bcl-2 em gliomas malignos, o que mostra a menor atividade apoptótica nestes tumores (TIRAPELLI et al., 2010).

A XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) é uma proteína, membro da família das IAPs, que possui a capacidade de inibir tanto as caspases iniciadoras (caspase 9), como as caspases efetoras (caspases 3 e 7), sendo o principal membro desta família. Sua estrutura é composta por três elementos principais. Um domínio de repetição BIR (*Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat*), composto por cerca de 70 aminoácidos, que é característico de todas as IAPs. Um domínio UBA (*Ubiquitin-associated domains*), que permite a XIAP se ligar a ubiquitina e um domínio de ligação de zinco, ou um anel carboxi-terminal. A XIAP tem sido caracterizada com três domínios BIR amino-terminal, seguido por um domínio UBA e, finalmente, um domínio em ANEL, carboxi-terminal. As repetições do domínio BIR permitem a XIAP se ligar as caspases (DUCKETT et al., 1998; DEVERAUX; REED, 1999; HUANG et al., 2001; WILKINSON et al., 2004).

A alta expressão da proteína XIAP é uma causa importante da resistência a apoptose, todavia esta alta expressão não é responsável por aumentar a resistência tumoral a quimioterápicos (SEEGER et al., 2010). Por outro lado, a diminuição dos níveis de XIAP contribui para o tratamento do câncer por inibir a proliferação celular, induzir a apoptose e aumentar a sensibilidade quimioterápica (TONG et al., 2005; MA; CHEN; XIN, 2009; LACASSE, 2013).

Além da oncologia, a XIAP aparece como importante marcador para diferentes sistemas. No desenvolvimento dos neurônios granulares do cerebelo, a XIAP tem papel de destaque para a sobrevivência desta variedade neuronal, por mecanismos que envolvem a inibição das caspases (BLANCAS et al., 2014).

Em doenças neurodegenerativas, como a atrofia de múltiplos sistemas (AMS) - um Parkinsonismo atípico - que, dependendo dos sintomas predominantes, é dividido em: degeneração estriatonigral, atrofia olivo-ponto-cerebelar ou síndrome de Shy-Drager. A XIAP tem papel importante na sua patogênese, uma vez que portadores desta patologia mostram

marcação intensa de XIAP em inclusões citoplasmáticas gliais e neuronais se comparado a indivíduos saudáveis (KAWAMOTO et al., 2013).

Além dos danos relacionados a apoptose decorrente do consumo de etanol, este também interfere com as vias de sinalização para desenvolvimento cerebral e de outros tecidos (MIKI et al., 2013). Os fatores de crescimento relacionado à insulina (IGFs) são famílias de proteínas mitogênicas envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação celular, que apresentam elevado grau de homologia estrutural com a pró-insulina, sendo produzidos na maioria dos órgãos e dos tecidos do organismo e sua secreção ocorre à medida que são produzidos, não existindo órgão de armazenamento. Seu receptor, IGF-1R (receptor do fator de crescimento relacionado à insulina tipo1), desempenha papel fundamental na regulação das funções cognitivas e motoras de vários tipos de células do SNC (DE LA MONTE et al., 2009).

O IGF-1R (*Receptor-like growth factor insulin-1*) contém em sua estrutura duas subunidades α e duas subunidades β de 135 kDa e 90 kDa, respectivamente. Estas subunidades (α e β) se ligam por uma ponte dissulfídrica, formando um α - β hemireceptor que, por sua vez, se liga a outro hemireceptor idêntico, para formar a estrutura completa do IGF-1R. A subunidade α , extracelular, contém os sítios de ligação que são ricos em cisteína e unem-se aos ligantes na proporção de 1 molécula para 1 receptor. A subunidade β é composta de: uma porção extracelular, um seguimento transmembrânico e uma parte intracelular, com um sítio acoplador de ATP e uma região com atividade tirosina-quinase intrínseca que, quando ativada, promove a fosforilação de resíduos de tirosina do próprio receptor e de proteínas-substrato associadas. Múltiplas vias de sinalização, entre elas a via da fosfoinositol-3-quinase (PI3K) e das MAP (*Mitogen-activated protein*) quinases, são assim ativadas. O IGF-1R apresenta alta afinidade, tanto pelo IGF-1 (*Insulin growth factor-1*) quanto pelo IGF-2 (*Insulin growth factor-2*). A maioria das ações conhecidas dos IGFs é mediada via IGF-1R. A presença dos receptores de IGF em diversos tipos celulares está associada à expressão dos genes dos IGFs em vários tecidos (MARTINELLI JR; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008).

Anormalidades na função cerebelar após a exposição pré-natal crônica ao etanol estão associadas com a inibição da insulina / IGF, por vias de sinalização que diminuem as atividades dos receptores de insulina e dos IGF-1R (MIKI et al., 2013).

O IGF-1 tem sido associado a efeitos neuroprotetores, porém pouco se conhece sobre seu papel na demência vascular. A baixa expressão do IGF no hipocampo de animais com demência vascular ocasiona prejuízos à capacidade de aprendizado e memória (GONG et al., 2012)

Os membros do sistema *insulin-like growth factors* (IGFs), incluindo o IGF-1, IGF-2, receptores de IGF-1 e IGF-2 (IGF-1R e IGF-2R) e as proteínas de ligação de IGF (IGFBPs - *Insulin-like growth factor binding protein*) possuem papel importante no desenvolvimento e na progressão de neoplasias (CASTRO; GUERRA-JUNIOR, 2005; CHEN; SHARON, 2013). Mais especificamente, as IGFs promovem a progressão do ciclo celular e inibem a apoptose tanto por ação direta com outros fatores de crescimento como por ação indireta, interagindo com outros sistemas moleculares intracelulares envolvidos na promoção ou progressão do câncer (CASTRO; GUERRA-JUNIOR, 2005). O IGF-1 e IGF-2 são importantes agentes mitogênicos em uma ampla variedade de cânceres, entre eles: o câncer de próstata, câncer de mama, o câncer do cólon e o mieloma (CHEN; SHARON, 2013).

Atualmente dados clínicos disponíveis com terapêutica anti-IGF-1R têm demonstrado que estas abordagens orientadas são viáveis e podem induzir atividades antitumorais fortes em vários tipos de cânceres, incluindo aqueles refratários à terapêutica padrão. No entanto, a eficácia é susceptível de ser limitada a um pequeno subconjunto de pacientes, uma vez que uma variedade de mecanismos pode conferir resistência intrínseca ou adquirida a terapêutica anti-IGF-1R, (CHEN; SHARON, 2013).

Além disso, o IGF-1R atua na regulação da caspase-3, que também participa da diferenciação celular. Esta regulação ocorre pelo controle da expressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e a família das IAPs, mediada pelo fator NF- κ B. A elevação dos níveis de ativação de caspase-3 direciona o destino celular, que passa da diferenciação celular para apoptose. O sinal de sobrevivência das células, mediado por IGF-1R/ NF- κ B, é um regulador essencial da ativação de caspase-3 para sua função não apoptótica na sinalização da diferenciação celular (BASU; RAJAKARUNA; MENKO, 2012).

Com base nas diferentes funções apresentadas pelas proteínas caspase 3, XIAP e IGF-1R, sua localização em vários tecidos e sua participação no desenvolvimento, diferenciação e maturação dos sistemas, além das patogêneses decorrentes de sua desregulação, estas podem ser

utilizadas como importantes marcadores para os estudos das lesões decorrentes do consumo crônico de etanol em diferentes órgãos alvos.

2 JUSTIFICATIVA

O cerebelo sofre limitação do crescimento, morte celular, deficiências cognitivas e de memória frente ao etanol em ratos neonatais (IDRUS et al., 2011; VAN SKIKE et al., 2010; ROGERS et al., 2012; ZEEUW et al., 2012). Os neurônios de Purkinje são sensíveis às variações sanguíneas agudas e crônicas frente ao etanol em diferentes idades (FATTORETTI et al., 2003; GHIMIRE et al., 2009), sendo os estratos granular e molecular também alterados (GREEN, 2004). A lesão cerebelar pode decorrer de morte celular apoptótica, desencadeada por doenças ou após insultos exógenos (LEE; McKINNON, 2009; OLIVEIRA, et al. 2014b; SUZANNE; KRIL, 2014). Existem duas vias principais que conduzem à apoptose: extrínseca, que ativa a caspase-8 e intrínseca, que culmina com a clivagem e ativação da pró-caspase-3 (OLNEY et al., 2002; YOUNG et al., 2003). A caspase-3 está relacionada com a fase efetuidora da morte celular programada, favorecendo a expressão de endonucleases de restrição que clivam o DNA. A XIAP tem papel antiapoptótico através da inibição das caspases efetoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9 e modula o fator de transcrição NF-kB. Já os fatores de crescimento relacionado à insulina (IGFs) são famílias de proteínas mitogênicas envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação celular, em que seu receptor (IGF-1R: receptor do fator de crescimento relacionado à insulina tipo1) desempenha papel fundamental na regulação das funções cognitivas e motoras de vários tipos de células do SNC (DE LA MONTE et al., 2009). Essas proteínas são marcadores dos mecanismos de sinalização que, uma vez alteradas, podem conduzir a déficits neurológicos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Alterações apoptóticas no cerebelo de ratos com predileção ao etanol tendo diferentes padrões de consumo da droga por tempo de exposição podem colaborar nas vias de ação do etanol e na correlação com as dúvidas existentes nas vias de sinalização cerebelar. Ratos UChA e UChB são consumidores voluntários de etanol originários de colônias de ratos Wistar provenientes da Universidade do Chile (UCh) nos anos 70 (MARDONES; SEGOVIA-RIQUELME, 1983). A variedade de ratos UCh tem relevância nas investigações experimentais, pois o consumo voluntário de etanol aproxima os achados com a realidade do alcoolismo crônico humano.

3 OBJETIVOS

Avaliar a apoptose nos neurônios de Purkinje, Golgi e nas células granulares do cerebelo em ratos UChA adultos.

4 CAPÍTULO 1

APOPTOSE DAS CÉLULAS DE PURKINJE E GRANULARES DO CEREBELO DECORRENTE DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL

APOPTOSIS OF PURKINJE AND GRANULAR CELLS OF THE CEREBELLUM FOLLOWING CHRONIC ETHANOL INTAKE

Publicado em: *Cerebellum* 13: 728-38, 2014. doi: 10.1007/s12311-014-0591-2

OLIVEIRA, S.A.; CHUFFA, L. G. A.; FIORUCI-FONTANELLI, B. A.; NETO, F. S. L.; NOVAIS, P. C.; TIRAPELLI, L. F.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E. Apoptosis of Purkinje and Granular Cells of the Cerebellum Following Chronic Ethanol Intake. *The Cerebellum*, v.13(6), p.728-738, 2014

Apoptose das células de Purkinje e granulares do cerebelo decorrente do consumo crônico de etanol

Suelen A. Oliveira^a, Luiz Gustavo A. Chuffa^b, Beatriz Aparecida Fioruci-Fontanelli^b, Fermino Sanches Lizarte Neto^c, Paulo Cezar Novais^c, Luiz Fernando Tirapelli^c, Jorge Camargo Oishi^d, Luiz Fernando Takase^e, Maira Aparecida Stefanini^e, Marcelo Martinez^e and Francisco Eduardo Martinez^{b*}.

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil, 18618-970.

^b Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil, 18618-970.

^c Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina, USP – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 14049-900

^d Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 13565-905

^e Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 13565-905

Título: Etanol causa apoptose no cerebelo

*** Endereço para correspondência:**

Francisco Eduardo Martinez, Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Caixa Postal 510, CEP: 18618-970, Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil, Telefone: +55 (14) 3880-0024, Fax: +55 (14) 3815-3744, martinez@ibb.unesp.br

Resumo

O etanol altera a motricidade, o aprendizado, cognição e metabolismo celular do cerebelo. Buscou-se avaliar a apoptose nos neurônios de Golgi, Purkinje e células granulares do cerebelo de ratos adultos UChA. Dois grupos de 20 animais foram montados: um grupo controle, não consumidor de etanol; e um grupo experimental de ratos UChA, consumidores de etanol a 10% (<2g etanol/Kg peso corpóreo/dia). Dos 65 dias aos 120 dias de idade os animais receberam solução de etanol a 10%. Aos 120 dias de idade, os animais foram anestesiados e preparados para eutanásia. O cerebelo foi analisado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), imunistoquímica para apoptose, caspase-3 (pró-apoptótica), XIAP (antiapoptótica) e IGF-1R nos neurônios de Golgi, Purkinje e granulares. Avaliou-se também por RT-PCR os genes reguladores de caspase-3, XIAP e IGF-1R no córtex cerebelar. Houve acúmulo de gotas lipídicas, presença de núcleos eletrodensos, desorganização do corpo medular do cerebelo com alterações na bainha de mielina no córtex cerebelar. Identificou-se também aumento significativo da imunomarcagem de caspase-3 e XIAP nos neurônios de Purkinje e granulares. A fragmentação do DNA foi significativa nas células de Purkinje. O IGF-1R não apresentou alterações. Não houve diferenças significativas na expressão dos genes de caspase-3, XIAP e o IGF-1R. Concluiu-se que o etanol induz apoptose nas células de Purkinje e granulares do cerebelo de ratos adultos UChA.

Palavras-chaves: XIAP, IGF-1R, caspase-3, cerebelo e ratos UChA.

Introdução

O alcoolismo afeta milhões de pessoas em todo o mundo. É caracterizado pelo consumo excessivo de etanol e está associada com vários riscos a saúde. Conceitua-se como uma síndrome multifatorial com comprometimento físico, mental e social [1, 2], alterando estruturas e funções do cérebro e, em alguns casos, pode conduzir à neurodegeneração [3].

A exposição pré-natal ao etanol diminui o volume cerebral. No cerebelo, onde esta redução é mais intensa, a exposição pré-natal a droga leva à degeneração das funções cognitivas e comportamentais [4]. Ao longo de seu desenvolvimento, o cerebelo mostra-se extremamente vulnerável ao consumo do álcool em grandes quantidades, o que ocasiona prejuízos às células de Purkinje, granulares e da glia [5, 6]. Os neurônios de Purkinje são os elementos dominantes do processamento de informações cerebelar [7], podendo levar a prejuízos na coordenação motora quando expostos ao etanol, uma vez que esta substância é capaz de ocasionar apoptose nos neurônios de Purkinje e granulares [8-12].

Há duas vias principais que conduzem à apoptose: uma via extrínseca, que ativa a caspase-8; e uma via intrínseca, que culmina com a clivagem e ativação da pró-caspase-3. A ativação da caspase-3 produz alterações morfológicas típicas da apoptose [13, 14]. Embora a via apoptótica tenha sido extensivamente estudada no cerebelo, não há pesquisas que identifiquem as alterações apoptóticas características de animais com predileção ao etanol, os quais exibem diferentes padrões de consumo da droga por tempo de exposição.

Algumas proteínas representam importantes marcadores dos mecanismos de sinalização, tanto para diferenciação e crescimento celular, como para apoptose, as quais, uma vez alteradas, podem conduzir a déficits neurológicos importantes [15]. Os fatores de crescimento relacionados

à insulina (IGFs) são famílias de proteínas mitogênicas envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação celular, sendo que seu receptor IGF-1R (receptor do fator de crescimento relacionado à insulina tipo1) desempenha papel fundamental na regulação das funções cognitivas e motoras de vários tipos de células do Sistema Nervoso Central (SNC) [16]. A caspase-3 (*Cystein-proteinase-aspartic-ase-3*) e a XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) estão envolvidas na apoptose induzida pelo etanol. A caspase-3 está relacionada com a fase efetuada da morte celular programada, favorecendo a expressão de endonucleases de restrição que clivam o ácido desoxirribonucléico (DNA). A XIAP tem papel antiapoptótico através da inibição das caspases efetoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9 e por modular o fator de transcrição NF-kB (*Nuclear fator Kappa Beta*) [15]. Desta forma, tais proteínas se destacam como marcadores para as lesões cerebelares decorrentes do consumo de etanol.

Ratos UChA e UChB são consumidores voluntários de etanol originários de colônias de ratos Wistar provenientes da Universidade do Chile (UCh) nos anos 70 [17-19]. Tais animais compreendem importante modelo para o estudo sobre os efeitos do consumo de etanol em diferentes sistemas fisiológicos, assim como das patologias desencadeadas pelo alcoolismo (por exemplo, dependência ou síndrome de abstinência). Desta forma, o objetivo de nossa pesquisa foi avaliar a apoptose nos neurônios de Purkinje, Golgi e nas células granulares do cerebelo em ratos adultos UChA.

Materiais e Métodos

Animais

Quarenta ratos adultos machos provenientes do Laboratório do Departamento de Anatomia (Instituto de Biociências, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil). Os animais permaneceram acondicionados individualmente em caixas de polietileno medindo 40x30x15cm, com fundos sólidos, forradas com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro) e temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Os animais UChA constituem um modelo de ratos com predileção ao etanol, desenvolvidos por reprodução seletiva, com propensão genética ao consumo espontâneo de etanol 10% (v/v) (<2 g de etanol / kg de peso corporal / dia). Aos 50 dias de idade, 40 ratos UChA receberam, durante 15 dias de experimento, um frasco de água *ad libitum* e um contendo solução de etanol a 10% (v/v), sendo que ambos foram alternados periodicamente. Após este período, foram selecionados 20 animais para cada grupo com consumo de etanol inferior a 2g de etanol /kg de peso corporal /dia, de acordo com o protocolo de Mardones e Segovia-Riquelme [20]. O grupo UChA (n = 20), constituído de ratos com livre escolha entre uma solução de etanol 10% (v/v) e *ad libitum*, que consumiram entre 0,1 e 2,0g de etanol /kg/ dia e um grupo Controle (n = 20) que consiste em ratos sem acesso ao etanol. Nos animais estudados, o índice de preferência associado com o comportamento de procura ao álcool foi de aproximadamente 65%. A partir do início do experimento (65 dias de idade) até a eutanásia (120 dias), os ratos UChA consumiram etanol 10% (v/v) por 55 dias (Fig. 1). O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, Instituto de Biociências, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Botucatu) protocolo nº 051/04-CEEA.

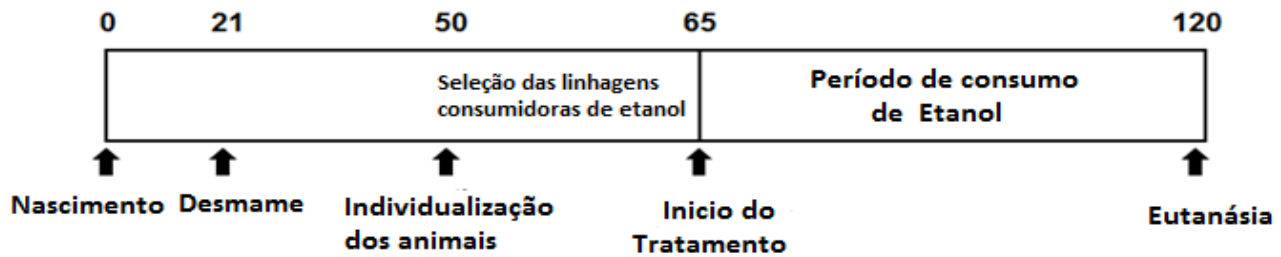


Figura 1. Representação esquemática do período experimental dos animais UChA, do nascimento à eutanásia.

Microscopia eletrônica de Transmissão

Quatro ratos de cada grupo foram anestesiados através da administração de cloridrato de quetamina (50mg/ml) (Ketalar/ laboratório: Parke-Davis) e xilazina (20mg/ml) (Rompum/ laboratório: Bayer) em doses de 90mg/kg e 10mg/kg de peso, respectivamente. Para indução anestésica as duas drogas foram ministradas simultaneamente, via cavidade peritoneal. Amostras dos cerebelos de cada animal foram coletadas após perfusão intracardíaca de solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Fragmentos com 0,5 mm foram imersos no mesmo fixador por três horas. Posteriormente, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1,0%, desidratados em etanol e incluídos em resina plástica araldite. Secções de 50 a 60 nanômetros de espessura foram obtidas no ultramicrotomo Leica UCT. Os cortes foram então contrastados em acetato de uranila (3%), por 5 minutos, citrato de chumbo por 1 minuto, sendo a seguir examinados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100.

Análise Imunoistoquímica

Cinco animais de cada grupo foram submetidos à mesma técnica de indução anestésica acima descrita. A seguir, foram submetidos à toracotomia com exposição da área cardíaca, sendo

perfundidos pelo ventrículo esquerdo com solução fixadora de paraformaldeído 4% (Paraformaldehyde, Sigma Chemical Co., USA) em tampão fosfato salino (PBS), a 0,1M, pH 7,4. Foi realizada craniotomia com dissecação do cerebelo, acondicionando-o no mesmo fixador.

Deteção in situ da apoptose através do TUNEL

A detecção das células em apoptose foi baseada na reação *in situ* da enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) com o nucleotídeo biotilado para detecção de fragmentação do DNA (TUNEL), em material incluso em parafina. O Kit FragEL™ DNA (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) foi realizado segundo instruções do fabricante. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris e montadas com Permount. Os controles negativos foram realizados pela não incubação com a enzima TdT.

Imunoistoquímica para caspase-3, XIAP, e IGF-1R

Os cerebelos coletados foram fixados por imersão em paraformaldeído a 4% e incluídos em parafina. A seguir, foram cortados com 3µm de espessura em micrótomo Reichert Jung 2040. As lâminas confeccionadas foram primeiramente coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) para a obtenção dos laudos histopatológicos. As reações imunoistoquímicas foram realizadas pelo método da avidina-biotina-imunoperoxidase. Após desparafinização, as secções foram hidratadas em séries alcoólicas. A recuperação antigênica foi realizada por calor, sendo as lâminas incubadas em tampão citrato 10mM, pH 6,0 e levadas à panela à Vapor Optisteam Plus por 40 minutos. A inibição da peroxidase endógena foi obtida através de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 15 minutos. Para bloqueio das reações inespecíficas utilizou-se *Background Sniper, Biocare Medical* (POLYMER Kit: MACH 4 Universal HRP).

Os cortes foram incubados *overnight* com os anticorpos primários: caspase 3 (CPP32 liofilizado monoclonal - Novocastra®) e XIAP (SC – 11426 policlonal – Santa Cruz®) diluídos a 1/200 em solução de 0,01M PBS em albumina bovina sérica 3% (BSA 3%). Já o IGF-1R foi incubado com anticorpos primários policlonais *rabbit* N-20 (SC-720 - policlonal – Santa Cruz®) para IGFR-1R, diluídos 1/50 em solução de 0,01M PBS em albumina bovina sérica (BSA 3%). As reações foram reveladas com cromógeno *Betazoid DAB* (BDB900G5) diluído em *Betrazoid DAB Substrate Buffer* (DS900L) do Kit MACH4, e montadas com Permount. As amostras para controles positivos foram encéfalos de ratos submetidos à isquemia.

As lâminas foram avaliadas em microscópio da marca Zeiss®, modelo Axioskop 2 plus, com câmara (Axio Cam Hrc ®) acoplada ao microscópio , sendo analisadas pelo programa Axio Vision 4.6®, em aumento de 400x. O número de células positivas de Golgi, Purkinje e células granulares foram contadas em cada grupo, em dez campos aleatórios por lâmina de imunistoquímica, sendo apresentados como as contagens médias dos grupos.

PCR em tempo real para o estudo da expressão gênica de Caspase-3 (apoptótico), XIAP (antiapoptótico) e IGF-1R (proliferação celular).

Amostras do cerebelo de seis animais foram acondicionadas em -80°C. Para extração do ácido ribonucleico (RNA) foi utilizado reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizou-se a transcrição reversa através do kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a análise da expressão diferencial dos genes caspase-3, IGF1R e XIAP, sendo realizado por sistema disponível comercialmente *TaqMan assay-on-demand*, composto por oligonucleotídeos e sondas (*Applied Biosystems*) para a análise quantitativa da expressão dos genes caspase-3 (Rn00563902_m1), IGF1R (Rn00583837_m1) e XIAP (Rn00573706_m1).

A amplificação foi realizada em volume final de 10µl, utilizando 5µl do reagente específico *Taqman Master Mix* (*Applied Biosystems*), 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA. Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas com aparelho de detecção de PCR em tempo real (*7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems*) Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em *ABI-7500 SDS software package*.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do *software GraphPad Prism 6*, sendo as diferenças entre os grupos comparadas pelo teste t não pareado. Os resultados foram apresentados como média ± desvio-padrão (DP), considerando-se estatisticamente significativas *P valor* < 0.05 (P valor: bicaudal).

Resultados

Microscopia Eletrônica de Transmissão

As células da camada granular apresentam citoplasma reduzido, membrana nuclear arredonda e nucléolo evidente. Os neurônios de Golgi apresentam membrana nuclear arredondada, cromatina frouxa e nucléolo evidente (Fig. 2a). Os neurônios de Purkinje são piriformes e grandes, caracterizam-se por corpo celular volumoso com núcleo de cromatina granulosa (Fig. 2b). A camada molecular mostra número reduzido de neurônios, sendo evidente a intensa arborização dendrítica (Fig. 2c).

As células da camada granular dos UChA apresentam cromatina condensada, além de prolongamentos na membrana nuclear. Observam-se também o citoplasma das células de Golgi e a camada molecular com gotas lipídicas. Neurônios de Purkinje com núcleos picnóticos e cisternas dos retículos endoplasmáticos dilatadas. Além disso, há redução no corpo medular do cerebelo, indicando ruptura da bainha de mielina (Fig. 2d-i).

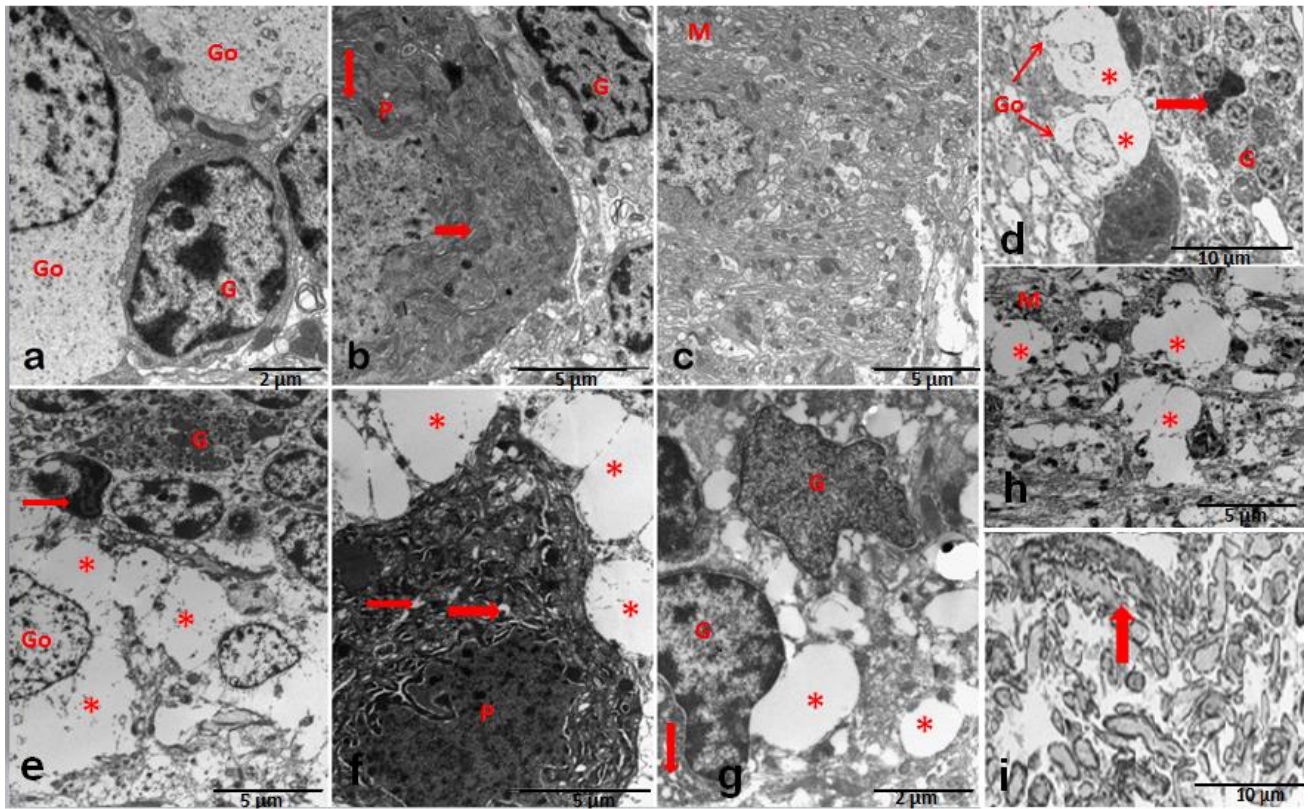


Figura 2 a-i. Eletromicrografias do cerebelo de ratos controles **(a-c)** e UChA **(d-i)**. **(a)** Células de Golgi (GO) e granulares (G) normais. **(b)** Células granulares (G) e neurônios de Purkinje (P). Presença de células de Purkinje com cisternas normais do retículo endoplasmático (seta). **(c)** Camada molecular com arranjo típico (M). **(d)** Edema citoplasmático das células de Golgi (GO) e gotas lipídicas (*); células granulares (G) com núcleos picnóticos (seta). **(e)** Células de Golgi (GO) com grande quantidade de gotas lipídicas (*) e camada Granular (G) com núcleo picnótico (seta). **(f)** Células de Purkinje com núcleo eletrodenso (P) e gotas lipídicas (*). Dilatação das cisternas do retículo endoplasmático (seta). **(g)** Camada granular (G) com numerosas gotas lipídicas (*) e cisternas dilatadas do retículo endoplasmático (seta). **(h)** Acúmulo de gotas lipídicas (*) na camada molecular (M). **(i)** Desorganização do corpo medular do cerebelo com mudanças na bainha de mielina (seta).

Imunoistoquímica para TUNEL, caspase-3, XIAP e IGF-1R

A apoptose foi identificada nos neurônios de Purkinje, células granulares e de Golgi dos ratos UChA (Fig. 3b, 3d) e dos ratos controles (Fig. 3a, 3c). Todavia, esta foi mais evidente nos animais UChA. A marcação para XIAP foi positiva nos neurônios de Purkinje e nas células granulares de ratos UChA (Fig. 3e). Não foram identificadas marcações para IGF-1R nos animais estudados (Fig. 4a, 4b).

As células de Golgi não apresentaram número significativo de marcações positivas para imunoistoquímica de TUNEL e caspase-3 (Fig. 5a, 6a). Entretanto o número de células positivas para XIAP foi menor nos ratos UChA que nos controles (Fig. 7a). Nos neurônios de Purkinje identificou-se maior número de células positivas para TUNEL, caspase-3 e XIAP nos ratos UChA (Fig. 5b, 6b, 7b). As células granulares mostraram marcação expressiva nos animais UChA para caspase-3 e XIAP (Fig. 6c, 7c), porém não foram identificadas diferenças significativas para TUNEL (Fig. 5c).

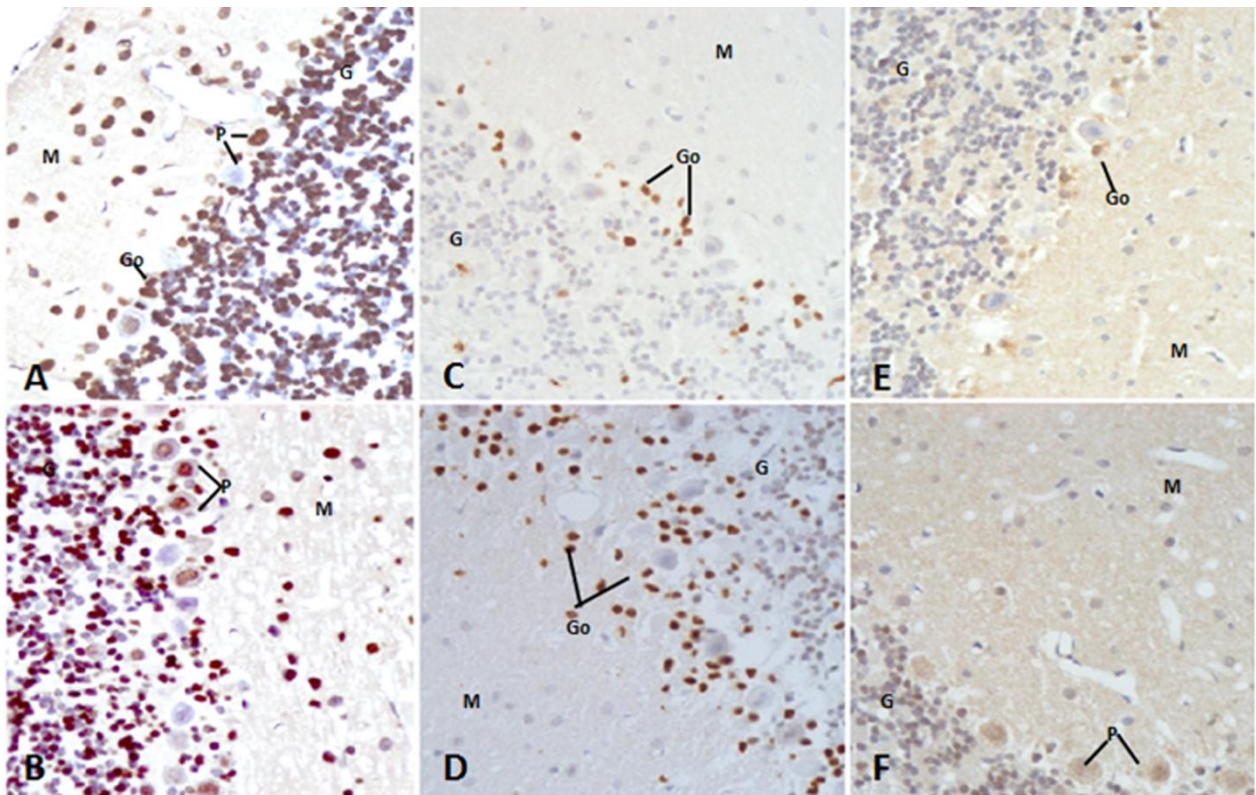


Figura 3 a-f. Imunoistoquímica do córtex cerebelar: camada molecular (M), células de Purkinje (P) e células granulares (G) (400×). **(a)** Neurônios de Purkinje marcados e sem marcação (P) para TUNEL nos ratos controles. **(b)** Células de Purkinje positivas (P) para TUNEL nos ratos UChA. **(c)** Neurônios de Golgi positivos (Go) para caspase-3 no grupo controle. **(d)** Neurônios granulares (G) e de Golgi (Go) marcados para caspase-3 no grupo UChA **(e)** Neurônios de Golgi (Go) positivos para XIAP nos controles. **(f)** Células de Purkinje (P) e granulares (G) marcadas para XIAP nos animais UChA.

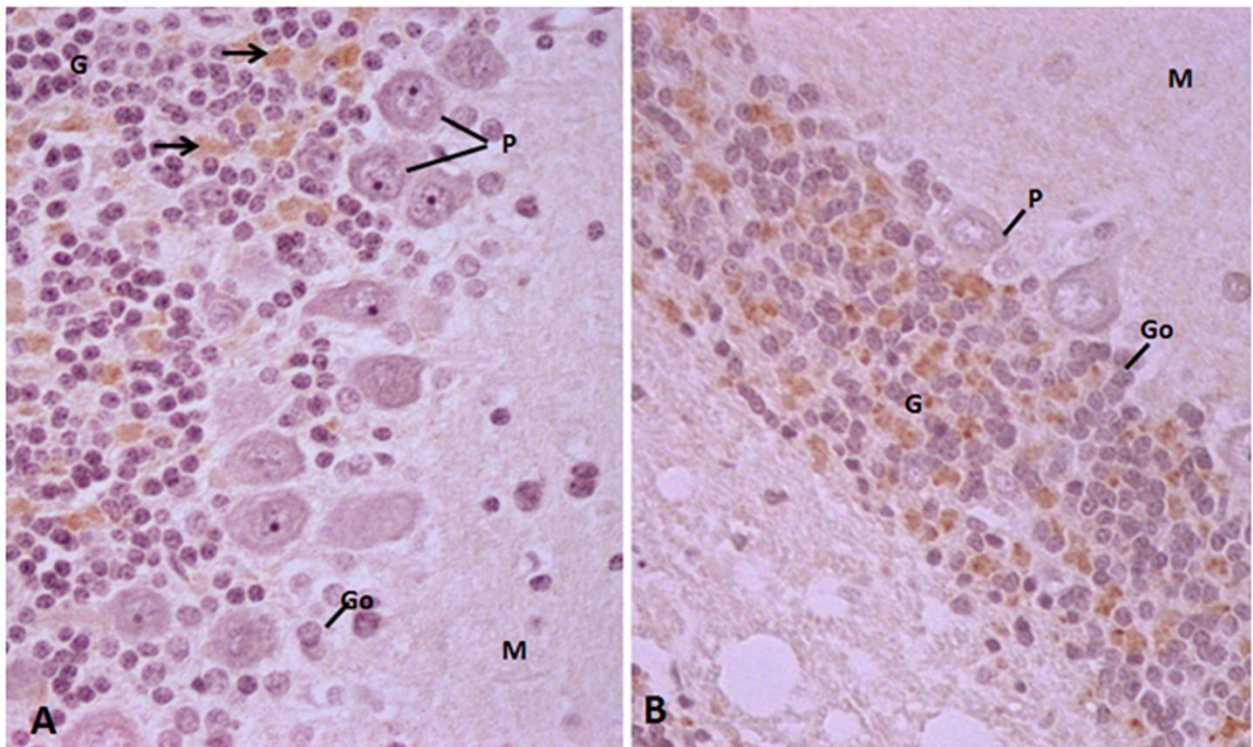


Figura 4 a, b. Imagens de imunistoquímica do cerebelo (400x) (a) ratos controle, e (b) ratos UChA. Forte marcação positiva de IGF-1R em áreas glomerulares (seta).

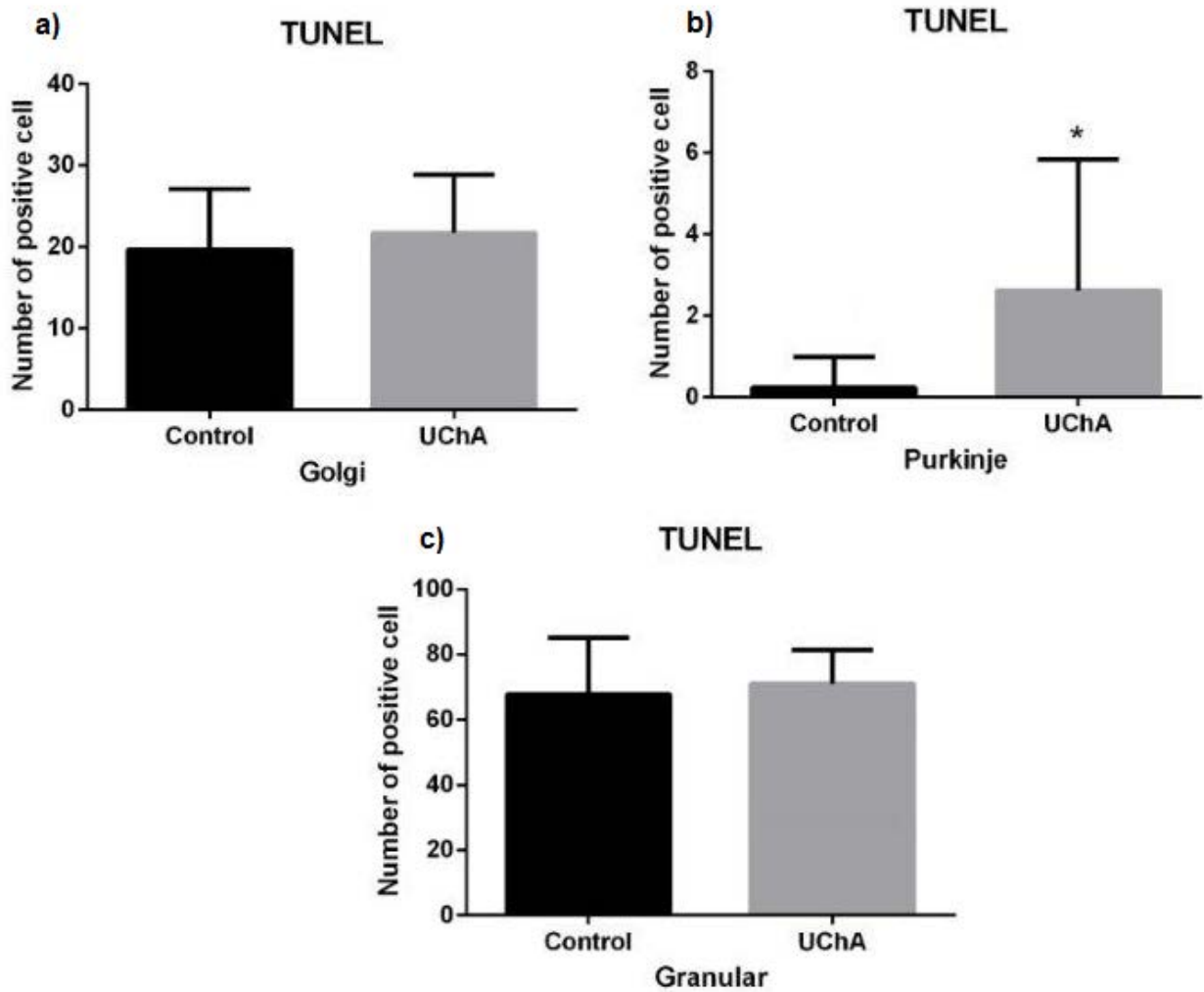


Figura 5 a-c. Análise de imunistoquímica da apoptose (TUNEL) em (a) neurônios de Golgi (b) Purkinje, e (c) células granulares. Número de células positivas em dez campos aleatórios (média \pm DP). * $P < 0.05$, t -test não pareado, $n = 5$ ratos/grupo.

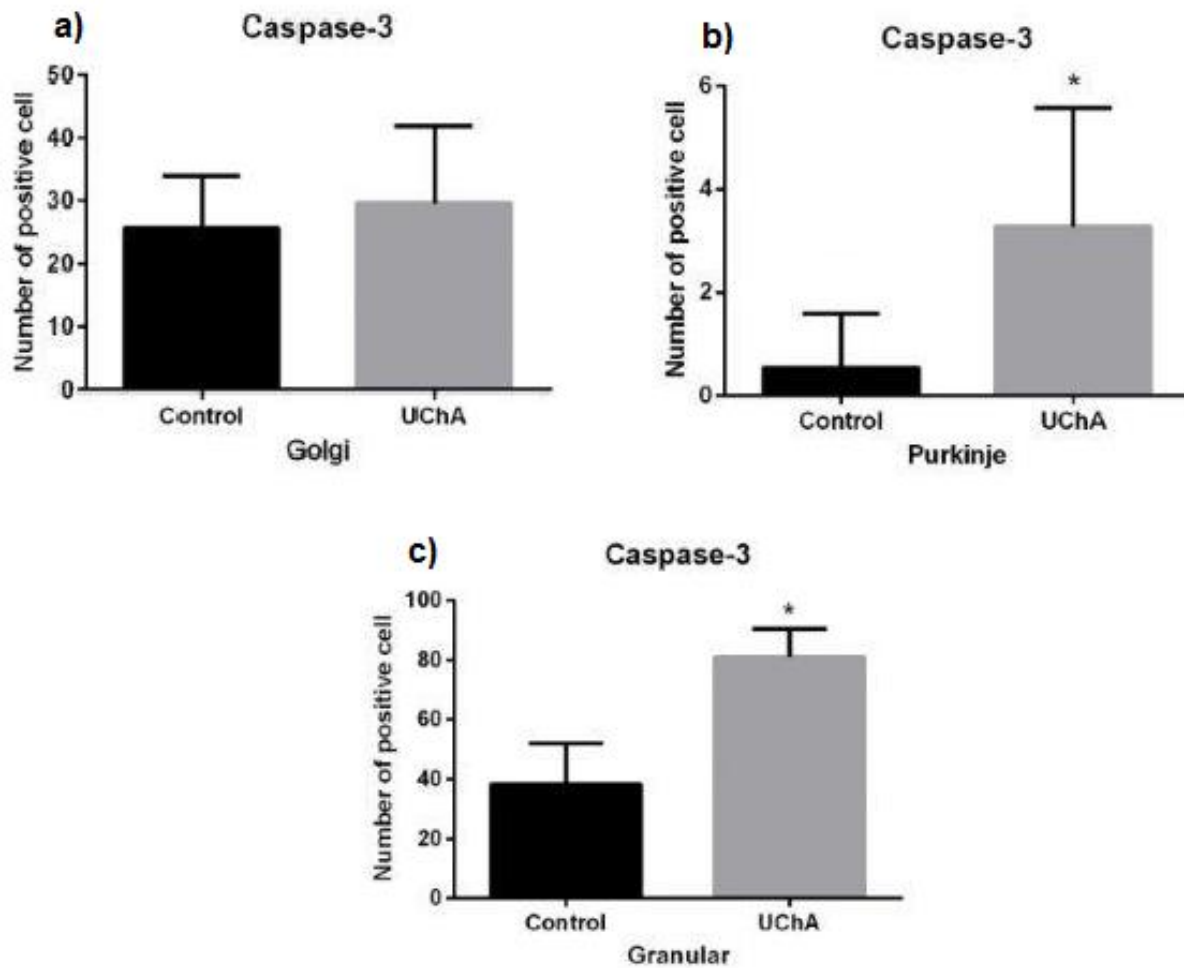


Figura 6 a-c. Análise imunoistoquímica da caspase-3 em (a) neurônios de Golgi (b) Purkinje, e (c) células granulares. Número de células positivas em dez campos aleatórios (média \pm DP). * $P < 0.05$, t -test não pareado, $n = 5$ ratos/grupo.

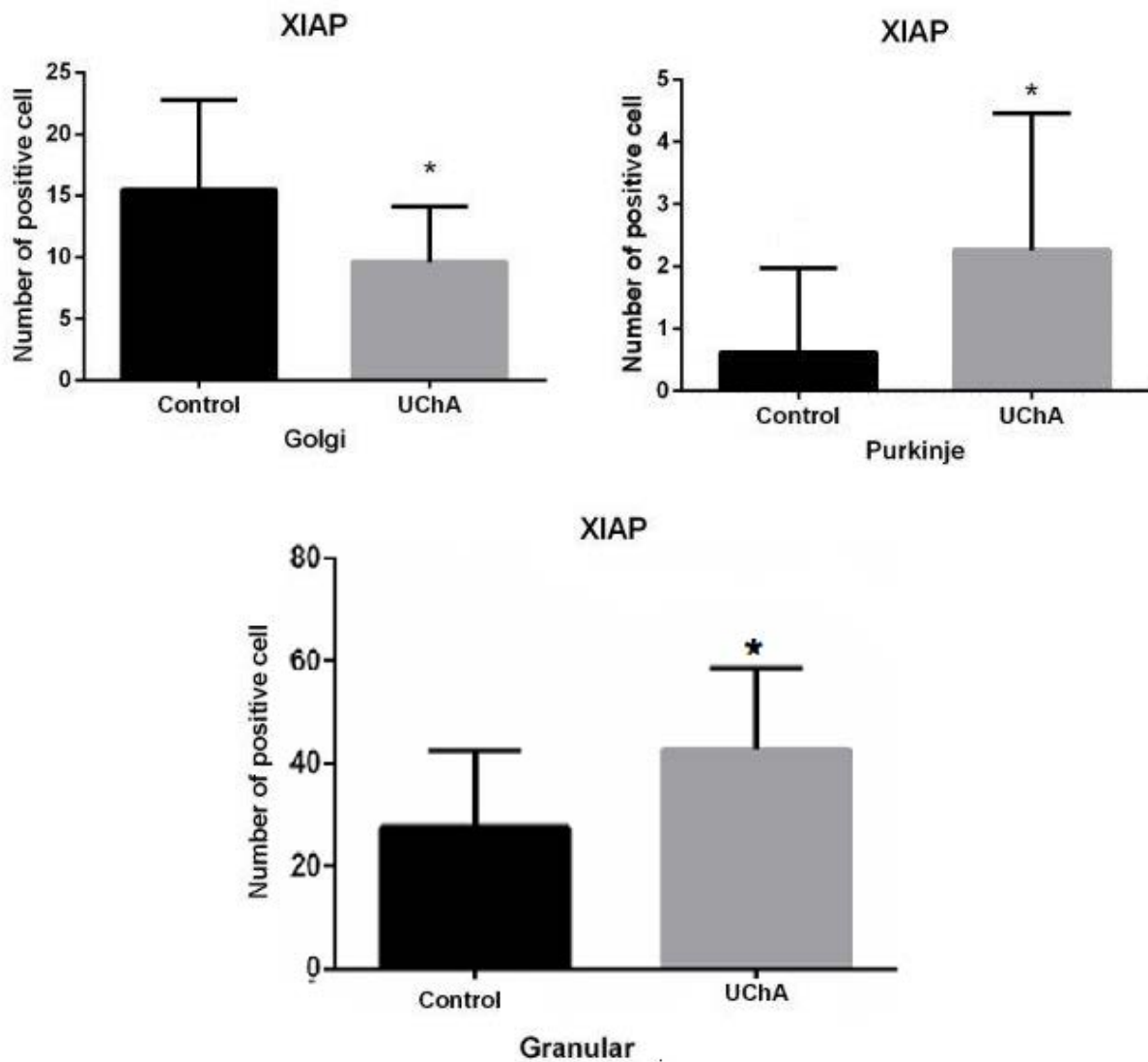


Figura 7 a-c. Análise imunoistoquímica da XIAP em (a) neurônios de Golgi (b) Purkinje, e (c) células granulares. Número de células positivas em dez campos aleatórios (média ± DP). * $P < 0.05$, t -test não pareado, $n = 5$ ratos/grupo.

Expressão gênica de caspase-3, XIAP e IGF-1R

A expressão dos genes da caspase-3, XIAP e IGF-1R manteve-se inalterada na presença de etanol, sugerindo modificações pós-traducionais para estas proteínas alvo (Fig. 8a-c).

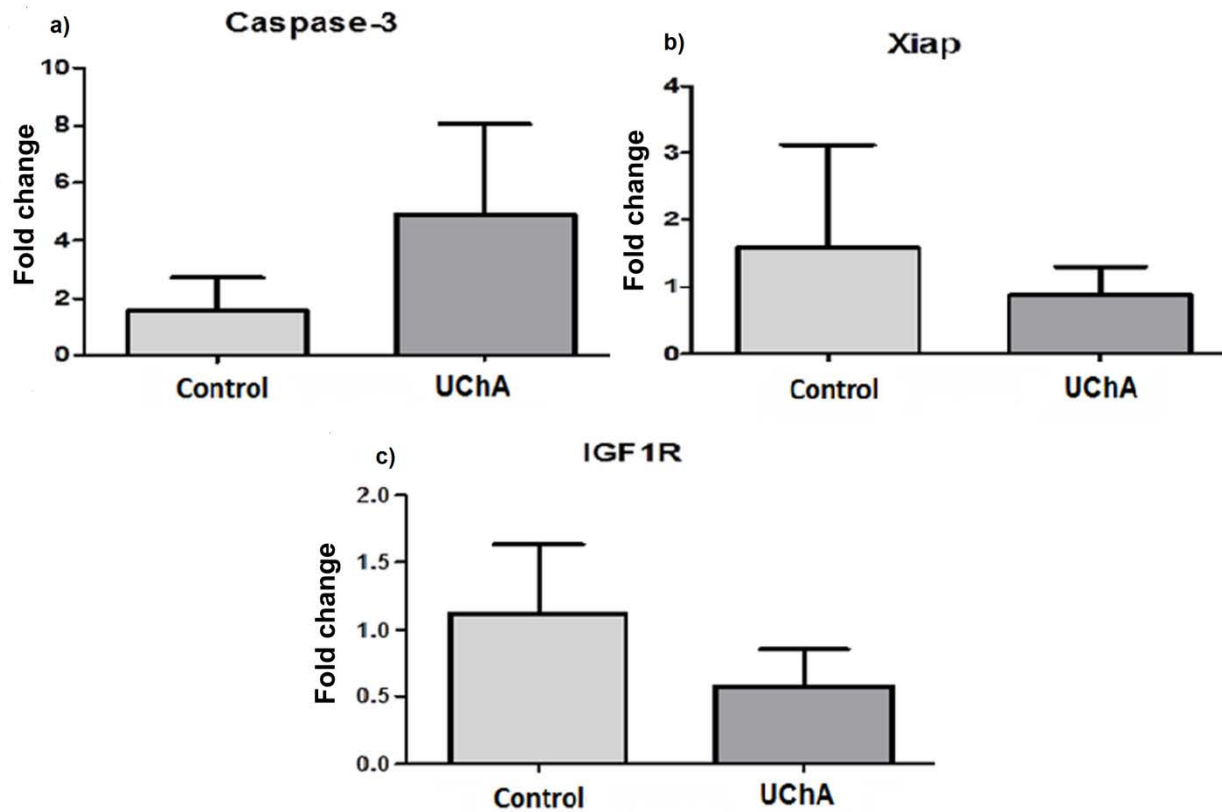


Figura 8 a-c. Análise da expressão gênica de (a) caspase-3, (b) XIAP e (c) IGF-1R no córtex cerebelar. Média ± DP, * $P < 0.05$, t -test não pareado, $n = 6$ ratos/grupo.

Discussão

A apoptose no córtex cerebelar de ratos foi observada utilizando-se os métodos de microscopia eletrônica de transmissão (MET), imunistoquímica para apoptose, caspase-3, XIAP e IGF-1R, além de PCR em tempo real para análise dos genes das proteínas acima citadas. A expressão gênica de caspase-3, XIAP e IGF-1R, quando alteradas em decorrência do consumo de etanol, favorecem o dano de estruturas necessárias para o funcionamento normal do cerebelo. Alterações na corrente de eventos apoptóticos podem conduzir a condições patológicas e malformações, como o câncer, doenças autoimunes e neurodegenerativas [16, 21, 22].

A ultraestrutura do cerebelo nos animais UChA mostrou sinais de morte celular típicos da toxicidade induzida pelo etanol. Trabalhos anteriores realizados com ratos UChA também demonstraram alterações na estrutura cerebelar, decorrente de alterações nos neurônios de Purkinje [23]. Lewandowska et al. [24] observaram alterações degenerativas nos neurônios de Purkinje e granulares durante o desenvolvimento cerebelar. Jaatinen e Rintali [25] relataram que, em ratos adultos, a exposição crônica ao etanol leva à atrofia cerebelar. As principais características neuropatológicas desta atrofia incluem perda das células de Purkinje e diminuição de suas conexões dendríticas na camada molecular. O etanol promove o estresse, lesões hepáticas persistentes e esteatose hepática, promovendo a lipólise e aumentando lipídios tóxicos. Destes lipídios tóxicos, as ceramidas agravam as lesões hepáticas, causando resistência à insulina, estresse oxidativo e ativação de citocinas pró-inflamatórias. Uma vez que estas são liberadas no sangue periférico, atravessam a barreira hematoencefálica e iniciam uma seqüência complexa de neurodegeneração. A resistência à insulina conduz a danos neurais e prejuízos na função de oligodendrócitos, levando à degradação da mielina, a qual, em seguida, ocasiona o aumento da produção de lipídios tóxicos no SNC. Além disso, os efeitos neurotóxicos diretos causados por

etanol e os seus metabólitos prejudicam a função mitocondrial e reduzem a integridade da membrana. Isto diminui o RNA mensageiro associado com a mielina, o qual responde à insulina e aumenta o índice de apoptose, o estresse oxidativo e a pré-oxidação lipídica, causando danos no DNA e interrupção da homeostase da acetilcolina, contribuindo para a neurodegeneração [16]. Além disso, o consumo crônico de etanol provoca desequilíbrios na homeostase neuronal de cálcio, resultando em dilatação do retículo endoplasmático liso (SER- *Smooth endoplasmic reticulum*) em neurônios de Purkinje de ratos idosos, que é acompanhado por morte neuronal ou apoptose axonal. O SER aloja o cálcio, essencial para o funcionamento neuronal [26]. A dilatação desta organela nas células de Purkinje foi observada em ratos adultos após 40 semanas de consumo de etanol, o que levou à degeneração dos segmentos dendríticos terminais [27-30]. Os indutores de estresse do retículo endoplasmático, como, por exemplo, o etanol, provocam alterações morfológicas por apoptose através da ativação da caspase-3 [31]. Esses mesmos achados foram identificados em nossa pesquisa, incluindo o aumento da caspase-3 nos ratos UChA.

A caspase-3 está aumentada nas células de Purkinje e granulares. Esta, quando ativada, é responsável pela clivagem proteolítica de amplo espectro de alvos celulares, conduzindo à morte celular [32]. Neste estudo, a análise da fragmentação do DNA indicaram lesões expressivas nos neurônios de Purkinje, semelhante aos achados de Taranukhin e colaboradores [33]. O cerebelo é particularmente vulnerável aos efeitos do etanol durante os primeiros 10 dias de vida, onde induz a perda de células de Purkinje e granulares. A morte neuronal neste período ocorre independente da forma de administração do etanol. Por outro lado, as células granulares mostram-se mais sensíveis ao etanol que as células de Purkinje, as quais apresentam uma redução de 20% em seu número quando as concentrações de álcool no sangue são menores que 150 mg/dl. A redução

equivalente a este número de células granulares nos neurônios de Purkinje só ocorre em concentrações de etanol de ≥ 300 mg / dL. Embora alguns investigadores tenham sugerido que a perda de células granulares é secundária à morte das células de Purkinje, há evidências de que o etanol provoca a morte direta dos neurônios granulares. A exposição crônica ao etanol também leva a degeneração dos dendritos de Purkinje e de suas sinapses na camada molecular. Além disso, as células granulares e interneurônios da camada molecular são as estruturas mais vulneráveis a toxicidade do etanol no cerebelo de animais adultos. Os mecanismos básicos subjacentes a estas alterações funcionais induzidas pelo etanol e da neuropatologia relacionada ao cerebelo incluem: excitotoxicidade, fatores dietéticos, deficiência de tiamina, alterações gliais, mudanças nos fatores de crescimento, mecanismos apoptóticos, estresse oxidativo e danos mitocondriais com prejuízos a produção de energia [25].

As proteínas inibidoras da apoptose ou IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) são moléculas que exercem seu papel antiapoptótico através da capacidade de inibir a atividade das caspases efetoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9 e de modularem o fator de transcrição NF- κ B. Um exemplo desta família é a proteína XIAP. Durante a apoptose, as IAPs são removidas por uma proteína liberada da mitocôndria, denominada Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI*). Após dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é lançada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo *c*. Enquanto o citocromo *c* liga-se à APAF-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) e ativa diretamente a caspase-9, a Smac/DIABLO remove as IAPs de sua ligação inibitória com as caspases[15]. Nossos resultados demonstram que a XIAP atua como elemento antiapoptótico nos neurônios granulares e de Purkinje dos ratos UChA. Nos animais controle, a expressão aumentada dessa proteína só esteve presente nos neurônios de Golgi, os quais não apresentaram

apoptose. Isto pode ser explicado pelo fato de que este modelo de animais pode ter desenvolvido novas estratégias para evitar a morte das células neuronais na presença de uma quantidade mínima de etanol, durante o período de seleção da linhagem UChA. Lee e colegas [34] obtiveram resultados semelhantes, quando a ingestão de etanol promoveu elevação da expressão de genes relacionados com a sobrevivência de células, tais como XIAP, Bcl-xl (*Bcl-2 related gene, long isoform*) e catalase. Embora, no fígado de ratos, a ingestão de álcool aumenta a expressão de p53 (*Protein p53*), Omi/HtrA2, Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*) e Bax (*Bcl-2 associated X protein*), sem afetar a expressão de XIAP ou a relação de Bcl-2/Bax [35], Antonio e colaboradores [36] demonstraram que neurônios do romboencéfalo fetal tratados com etanol apresentam redução na expressão dos genes da XIAP e do Bcl-2, com aumento na atividade da caspase-3 e formação de espécies reativas ao oxigênio (EROS), porém o tratamento com ácido lipóico exerceu efeito neuroprotetor. Contudo, o mecanismo pelo qual o etanol modula a expressão de XIAP ainda não é claro.

Não foram identificadas marcações de IGF-1R no córtex cerebelar dos ratos estudados, tal fato pode estar correlacionado com a idade dos animais [37]. Bondy (38) relata em sua pesquisa que o IGF-1 é abundante em células de Purkinje e no desenvolvimento de estações sinápticas, podendo ter papel importante tanto para formação como para mielinização de conexões sinápticas específicas.

A longo prazo, o etanol pode alterar a expressão de genes relacionados com a mielinização, apoptose, adesão celular, neurogênese e doença neural [39]. Genes que frequentemente são superexpressos por ação do álcool codificam proteínas de choque térmico (HSPs), as quais se relacionam com a transmissão sináptica e a plasticidade. O etanol diminui a

expressão de genes relacionados com a mielinização e à síntese protéica [40], corroborando os nossos achados de alterações da bainha de mielina no corpo medular do cerebelo.

A expressão dos genes reguladores da caspase-3 nos animais alcoólicos e da XIAP nos ratos controle mostraram-se alterados, apesar destes achados não serem estatisticamente significativos. Um aumento de EROS podem ativar diversas classes de genes, incluindo os dependentes do NF- κ B, que se ligam ao elemento de resposta aos antioxidantes (ARE). A XIAP (Bcl-x1) ou a catalase podem ser reguladas por mecanismos dependentes do NF- κ B. Além disso, a catalase também possui um elemento de resposta antioxidante que se liga a Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), sendo provável que o aumento da expressão gênica associada ao etanol é mediada pelos efeitos do aumento de EROS sobre os fatores de transcrição sensíveis a EROS [41]. A homeostase é mantida através do equilíbrio entre proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos como danos no DNA, desencadeados pelo consumo crônico de etanol, podem conduzir ao aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas, sendo a apoptose sua consequência [15]. Tal fato está de acordo com a identificação de caspase-3 nos neurônios de Purkinje e granulares dos animais UChA.

A expressão do gene regulador de IGF-1R foi evidente no grupo controle. O etanol diminui a produção de IGF em ratos e em culturas de neurônios cerebelares, além de sinais de hipoplasia cerebelar decorrente da insulina. Além disso, populações de neurônios de Purkinje e granulares foram reduzidas no cerebelo pelo consumo de etanol durante o desenvolvimento. Os fatores de crescimento regulam o ciclo celular. Demonstrou-se que o etanol aumenta o tempo em G1, atrasando o ciclo celular por diminuição das células em proliferação [42]. Nossos resultados mostraram uma diminuição no gene regulador do IGF-1R nos animais UChA, corroborando comos achados de Ewencyk et al. [21].

Os sintomas clínicos do consumo abusivo de etanol podem ser confundidos com as neuropatias relacionadas com a idade em pacientes humanos. No entanto, o uso prolongado de álcool diminui significativamente o número de conexões sinápticas dos neurônios de Purkinje [43], bem como a atividade de células granulares, aumentando a transmissão GABAérgica a partir dos neurônios de Golgi [44].

O cerebelo controla a coordenação motora, o equilíbrio, o tônus muscular, a aprendizagem motora e a cognição. Estas funções são, em parte, mediadas pelos neurônios do córtex cerebelar, que recebem sinapses excitatórias do sistema somatossensorial e do córtex cerebral. Estes impulsos excitatórios são retransmitidos pelas fibras musgosas originárias do tronco cerebral e da medula espinhal. Uma única fibra musgosa faz conexões sinápticas com centenas de células granulares e estas células fazem conexões excitatórias com os neurônios de Purkinje. A atividade das células granulares é regulada por impulsos gabaérgicos fornecidos pelas células de Golgi, as quais recebem impulsos excitatórios de fibras musgosas, axônios das células granulares e fibras trepadeiras. As conexões inibitórias são provenientes dos interneurônios da camada molecular e células de Purkinje [45]. Botta e colaboradores [46] identificaram um novo efeito do etanol sobre a fisiologia das células de Golgi, que envolve a atividade reduzida de um mecanismo de *feedback*, o qual normalmente resultaria em uma diminuição transitória da inibição das células granulares mediada pelo receptor GABA_A (*Gamma-aminobutyric acid ionotropic receptor family A*). Este efeito pode contribuir para a diminuição da capacidade de resposta das células granulares aos estímulos das fibras musgosas, o que se observa durante a exposição aguda ao etanol. Porém seus resultados mostraram que, embora a intoxicação ao etanol ocasione problemas motores e alterações cognitivas associadas ao dano celular de circuitos córtico-cerebelares, estes também podem decorrer da morte celular apoptótica induzida pelo etanol.

Desta forma, considera-se o etanol como uma substância lesiva tanto ao cerebelo de animais quanto ao do homem, em diferentes idades e com diferentes formas de exposição, sendo que a ação de algumas substâncias (por exemplo: neuroprotetores taurina, vitamina E, beta-caroteno, resveratrol) podem minimizar tais efeitos [33, 47-49].

Conclusão

O etanol causa apoptose das células de Purkinje e granulares no cerebelo de ratos adultos através da modulação de proteínas associadas à via apoptótica. Contudo, novos estudos são necessários para investigar como o dano neuronal induzido pelo etanol pode interferir com as conexões do cerebelo nas regiões corticais durante o desempenho motor, comportamental e cognitivo.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Sr. Wanderley Thiago da Silva pelo cuidado com os animais e ao Sr. Gelson Rodrigues pelo suporte técnico. Ao CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA (CME), Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP - Campus de Botucatu, pelo auxílio no processamento dos materiais e fotodocumentação.

Referências

1. Edwards G, Gross MM. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. *BMJ* 1976; 1: 1058-61.
2. World Health Organization. **The global status report on alcohol and health**. Geneva, 2014. [http:// www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/). Accessed: 7 Mar 2014.
3. Alfonso-Loeches S, Guerri C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Cl Lab Sci* 2011; 48:19-47.
4. De Smet HJ, Parquier PF, De Deyn PP, Marie P. The cerebellum and neurocognition: a review of clinical and neuroimaging studies. *AJCN* 2010; 4:1.
5. Maier SE, West JR. Regional differences in cell loss associate with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcohol* 2001;23: 49-57.
6. Sakata-Haga H, Sawada K, Hisano S, Fukui Y. Abnormalities of cerebellar foliation in rats prenatally exposed to ethanol. *Acta Neuropathol* 2001; 102(1):36-40.
7. Apfel MI, Esberard CA, Rodrigues FK, Bahamad FM, Jr Sillero RO. Stereological study of the cerebellar Purkinje cells submitted to alcoholic intoxication in wistar rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002; 60:258-63.
8. Ito M. *The cerebellum and neural control*. Raven Press, New York. 1984; 121-30.
9. Huang JJ, Yen CT, Tsao HW, Tsai ML, Huang C. Neuronal oscillations in Golgi cells and purkinje cells are accompanied by decreases in Shannon information entropy. *Cerebellum* 2013; 13:523-26.
10. Jaatinen P, Rintala J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. *Cerebellum* 2008; 7:332-47.

11. Luo J. Mechanisms of ethanol-induced death of cerebellar granule cells. *Cerebellum* 2012; 11:145-54.
12. Sarna JR, Hawkes R. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol* 2003; 70: 473-507.
13. Young C, Klocke BJ, Tenkova T, Choi J, Labruyere J, Qin,y-Q, Holtzman DM, Roth KA., Olney JW. Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death Differ.* 2003; 10:1148-55.
14. Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Labruyere J, Qin YQ, Ikonomidou C. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57Bl/ 6 mouse brain. *Dev Brain Res* 2002; 133:115-26.
15. Grivicich I, Regner A, Da Rocha AB. Morte celular por apoptose apoptosis: programmed cell death. *Rev Bras Cancerol* 2007; 53:335-43.
16. De La Monte SM, Longato L, Tong M, DeNucci S, Wands JR. The liver-brain axis of alcohol-mediated neurodegeneration: role of toxic lipids. *Int J Environ Res Public Health* 2009; 6:2055-75.
17. Quintanilla ME, Israel Y, Sapag A, Tampier L. The UChA and UChB rat lines: Metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. *Addict Biol* 2006; 11:310-23.
18. Chuffa LG, Amorim JP, Teixeira GR, Mendes LO, Fioruci BA, Pinheiro PF, Seiva FR, Novelli EL, de Mello Júnior W, Martinez M, Almeida-Francia CC, Martinez FE. Long-term exogenous melatonin treatment modulates overall feed efficiency and protects ovarian tissue against injuries caused by ethanol-induced oxidative stress in adult UChB rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35:1498-508.

19. Chuffa LG, Seiva FR, Fávaro WJ, Amorim JP, Teixeira GR, Mendes LO, Fioruci-Fontanelli BA, Pinheiro PF, Martinez M, Martinez FE. Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. *Reprod Toxicol* 2013; 39:40-49.
20. Mardones J, Segovia-Riquelme N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1983; 5:171-78.
21. Ewencyk A, Ziplow J, Tong M, De La Monte SM. Sustained impairments in brain insulin/IGF signaling in adolescent rats subjected to binge alcohol exposures during development. *J Clin Exp Pathol* 2012; 2:106. doi: 10.4172/2161-0681.1000106.
22. Maycotte P, Blancas S, Morán J. Role of inhibitor of apoptosis proteins and Smac/DIABLO in staurosporine-induced cerebellar granule neurons death. *Neurochem Res* 2008; 33(8):1534-40.
23. Oliveira SA, Fontanelli BAF, Stefanini MA, Chuffa LGA, Teixeira GR, Lizarte FSN, Tirapelli LF, Quitete VHA, Matheus SMM, Padovani CR, Martinez M, Martinez FE. Interaction of maternal separation on the UCh rat cerebellum. *Microsc Res Tech* 2014; 77: 44-51.
24. Lewandowska E, Stepień T, Wierzbą-Bobrowicz T, Felczak P, Szpak GM, Pasennik E. Alcohol-induced changes in the developing cerebellum. Ultrastructural and quantitative analysis of neurons in the cerebellar cortex. *Folia Neuropathol* 2012; 50(4):397-406.
25. Jaatinen P, Rintala J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. *Cerebellum* 2008; 332-47.
26. Dlugos CA, Pentney R J. Effects of chronic ethanol consumption on SER of Purkinje neurons in old F344 rats. *Alcohol* 2000; 20:125-32

27. Pentney RJ. Measurements of dendritic path lengths provide evidence that ethanol-induced lengthening of terminal dendritic segments may result from dendritic regression. *Alcohol Alcohol* 1995;30:87-96.
28. Pentney RJ, Dlugos CA. Cerebellar Purkinje neurons with altered terminal dendritic segments are present in all lobules of the cerebellar vermis of ageing, ethanol-treated F344 rats. *Alcohol Alcohol* 2000; 35:35-43.
29. Pentney RJ, Quackenbush LJ. Dendritic hypertrophy in Purkinje neurons of old Fischer 344 rats after long-term ethanol treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 1990;14:878-86.
30. Pentney RJ, Quackenbush LJ. Effects of long durations of ethanol treatment during aging on dendritic plasticity in Fischer 344 rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15:1024-30.
31. Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M., Honda A, Imaizumi K, Tohyama M. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett* 2003; 357:127-30.
32. Shi, Y. Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18:677-84.
33. Taranukhin AG, Taranukhina EY, Saransaari P, Podkletnova IM, Pelto-Huikko M, Oja SS. Neuroprotection by taurine in ethanol-induced apoptosis in the developing cerebellum. *J Biomed Sci* 2010; 17, doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S12.
34. Lee JH, Tajuddin NF, Druse AJ. Effects of ethanol and ipsapirone on the expression of genes encoding anti-apoptotic proteins and an antioxidant enzyme in ethanol-treated neurons. *Brain Res* 2009; 1249:54-60.
35. Guo R, Zhong L, Ren J. Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 attenuates chronic alcohol exposure-induced apoptosis, change in Akt and Pim signalling in liver. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(5-6) 463-68.

36. Antonio AM, Gillespie RA, Druse-Manteuffel MJ. Effects of lipoic acid on antiapoptotic genes in control and ethanol-treated fetal rhombencephalic neurons. *Brain Res* 2011; 1383:13-21.
37. Marks JL, Porte Jr D, Baskin DG. Localization of type I insulin-like growth factor receptor messenger RNA in the adult rat brain by *in situ* hybridization. *Mol Endocrinol* 1991; 5(8): 1158-68.
38. Bondy CA. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* 1991; 11:3442-455.
39. Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK, Mayfield RD. Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. *Neuropsychopharmacol* 2006; 31:1574-82.
40. Pignataro L, Varodayan FP, Tannenholz LE, Harrison NL. The regulation of neuronal gene expression by alcohol. *Pharmacol Ther* 2009; 124:324-35.
41. Lee JH, Tajuddin NF, Druse MJ. Effects of ethanol and ipsapirone on the expression of genes encoding anti-apoptotic proteins and an antioxidant enzyme in ethanol-treated neurons. *Brain Res* 2009; 1249:54-60.
42. Cassini C, Linden R. Prenatal exposure to ethanol: toxicity, biomarkers and detection methods. *Rev Psiqu Clin* 2011; 38:116-21.
43. Dlugos CA, Pentney RJ. Morphometric evidence that the total number of synapses on Purkinje neurons of old F344 rats is reduced after long-term ethanol treatment and restored to control levels after recovery. *Alcohol Alcohol* 1997; 32:161-72.
44. Botta P, Souza FMS, Sangrey T, Schutter E, Valenzuela F. Alcohol Excites Cerebellar Golgi Cells by Inhibiting the Na⁺ /K⁺ + ATPase. *Neuropsychopharmacol* 2010; 35:1984-96.

45. Botta P, Souza FMS, Sangrey T, Schutter E, Valenzuela F. Excitation of Rat Cerebellar Golgi Cells by Ethanol: Further Characterization of the Mechanism Alcohol Clin Exp Res 2012; 36(4):616-24.
46. Botta P, Zucca A, Valenzuela F. Acute ethanol exposure inhibits silencing of cerebellar Golgi cell firing induced by granule cell axon input. Front Integr Neurosci 2014; 8. doi: 10.3389/fnint.2014.00010.
47. Wang GH, Jiang ZL, Li YC, Li X, Shi H, Gao YQ, Vosler PS, Chen J. Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma 2011; 28(10): 2123-34.
48. Oomen CA, Farkas E, Roman V, Van Der Beek EM, Luiten PGM. Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. Front Aging Neurosci 2009; 1:4 doi: 10.3389/neuro.24.004.2009
49. Shirpoor A, Minassian S, Salami S, Khadem-Ansari MH, Ghaderi-Pakdel F, Yeghiazaryan M. Vitamin E protects developing rat hippocampus and cerebellum against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis. Food Chem 2009; 113:115-20

5 CAPÍTULO 2: ARTIGO – Versão publicada

**APOPTOSIS OF PURKINJE AND GRANULAR CELLS OF THE CEREBELLUM
FOLLOWING CHRONIC ETHANOL INTAKE**

Cerebellum 13: 728-38, 2014. doi: 10.1007/s12311-014-0591-2

OLIVEIRA, S.A.; CHUFFA, L. G. A.; FIORUCI-FONTANELLI, B. A.; NETO, F. S. L.; NOVAIS, P. C.; TIRAPELLI, L. F.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E. Apoptosis of Purkinje and Granular Cells of the Cerebellum Following Chronic Ethanol Intake. *The Cerebellum*, v.13(6), p.728-738, 2014

6 CONCLUSÕES

O etanol induz apoptose nas células de Purkinje e granulares do cerebelo de ratos adultos através da modulação de proteínas associadas à via apoptótica. As evidências despertam o interesse de investigações adicionais sobre a forma como as lesões neuronais induzidas pelo etanol interferem com conexões cerebelares para outras regiões corticais durante o desempenho motor, comportamental e cognitivo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

ALFONSO-LOECHES, S.; GUERRI, C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. **Crit. rev. clin.lab.sci**, v. 48, n.1, p.19-47, 2011.

ALLSOP, J.; TURNER, B. Cerebellar degeneration associated with chronic alcoholism. **J. neurol. sci.**,v.3,p.238–258,1966.

ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. **J. comp. neurol.**, v.145, p.353-397, 1972a.

ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: II. Phases the maturation of Purkinje cells and of molecular layer **J. comp. neurol.**, v.145, p.399-463, 1972b.

ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: III. Maturation oh the components of the granular layer. **J. comp. neurol.**, v.145, p.465-513, 1972c.

ANDERSEN, B.B. Reduction of Purkinje cell volume in cerebellum of alcoholics. **Brain res.**, v.1007, p.10–18, 2004.

APFEL, M.I. et al. Stereological study of the cerebellar Purkinje cells submitted to alcoholic intoxication in wistar rats. **Arq. neuropsiquiatr.**, v.60, p.258-263, 2002.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6032**: Abreviação de títulos de periódicos e publicações seriadas. Rio de Janeiro, 1989. 14p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002. 7p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Estrutura do trabalho acadêmico. Rio de Janeiro, 2011.

BAILEY, B.; SOKOL, R.J. Pregnancy and alcohol use: evidence and recommendations for prenatal care. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 51, p.436-444, 2008.

BAKER, K.G. et al. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. **Neuroscience.**, v.91, p.429-438,1999.

BASU, S.; RAJAKARUNA, S.; MENKO, A.S. Insulin-like growth factor receptor-1 and nuclear factor κ B are crucial survival signals that regulate caspase-3-mediated lens epithelial cell differentiation initiation. **J. biol. chem.**, v.287, n.11, p.8384-8397, 2012.

BLANCAS, S. et al. Endogenous XIAP, but not other members of the inhibitory apoptosis protein family modulates cerebellar granule neurons survival. **Int. j. dev. neurosci.**, v. 37,p.26-35, 2014.

BUGALHO, P.; CORREA, B.; VIANA-BAPTISTA, M. Papel do cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais bases científicas e modelos de estudo. **Acta med. port.**, v.19, p. 257-268, 2006.

CARMINATI, P.O. et al. Alterations in gene expression profiles correlated with cisplatin cytotoxicity in the glioma U343 cell line. **Genet. mol. biol.**, v. 33, p.159-169, 2010.

CASTRO, A.M.S.; GUERRA-JUNIOR, Gil. GH/IGF e neoplasia: o que há de novo nesta associação. **Arq. bras. endocrinol. metab.** v.49, n.5, p. 833-842, 2005.

CHEN, H.X.; SHARON, E. IGF-1R as an anti-cancer target- trials and tribulations. **Chin. j. cancer**, v.32, n.5,p. 242-252, 2013.

CHOCKKAN, V.; HAWKES, R. Functional and antigenic maps in the rat cerebellum: zebrin compartmentation and vibrissal receptive fields in lobule IXa. **J. comp. neurol.**, v.345, p.33-45, 1994.

CHU, J. et al. Gamma Secretase-Activating Protein Is a Substrate for Caspase-3: Implications for Alzheimer's Disease. **Biol. psychiat.**, v.77, p.720-728, 2014.

COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem j.**, v. 326, p.1-16, 1997.

COSENZA, R.M. **Fundamentos de neuroanatomia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.83-87.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell.**,v. 116, p. 205-219, 2004.

DE LA MONTE, S.M. et al. The liver-brain axis of alcohol-mediated neurodegeneration: role of toxic lipids. **Int. j. environ. res. public health**, v.6, p.2055-2075, 2009.

DE SMET, H.J. et al. The cerebellum and neurocognition: a review of clinical and neuroimaging studies. **AJCN**, v.4:1, 2010.

DEVERAUX, Q.L.; REED, J.C. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. **Genes dev.**, v.13, n.3, p.239–252, 1999.

DLUGOS, C.A. Ethanol-Induced Alterations in Purkinje Neuron Dendrites in Adult and Aging Rats: a Review. **Cerebellum**, p.1-8, 2015.

DOLAN, R.J. A cognitive affective role for the cerebellum. **Brain**, v.121, p.545-546, 1998.

DUCKETT, C.S. et al. Human IAP-Like Protein Regulates Programmed Cell Death Downstream of Bcl-xL and Cytochrome c. **Mol. cell. biol.**, v.18, n.1, p.608–615, 1998.

EDWARDS, G.; GROSS, M.M. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. **Br. med. j.**, v.1, n.6017, p.1058-1061, 1976.

EDWARDS, G. et al. Alcohol-Related Problems in the Disability Perspective; a Summary of the Consensus of the WHO Group of Investigators on Criteria for Identifying and Classifying Disabilities Related to Alcohol Consumption. **J. stud. alcohol drugs.**, v. 37, n.9, p.1360-1382, 1976.

FARBER, N.B.; CREELEY, C. E.; OLNEY, J.W. Alcohol-induced neuroapoptosis in the fetal macaque brain. **Neurobiol. dis.**, v.40, n.1, p.200-206, 2010.

FATTORETTI, P. et al. Ethanol-induced decrease of the expression of glucose transport protein (Glut3) in the central nervous system as a predisposing condition to apoptosis: the effect of age. **Ann. N. Y. Acad. sci.**, v.1010, p.500-503, 2003.

GASS, J.T.; OLIVE, M.F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. **Biochem. pharmacol.**, v.75, p.218-265, 2008.

GHEZ, C. The cerebellum. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. (Eds.). **Principles of neural science**. New York: Elsevier, 2001. p.626-646.

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

GILPIN, N.W.; KOOB, G.F. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. **Alcohol res. health**, v.31, n.3, p.185-195, 2008.

GONG, X. et al. Down-regulation of IGF-1/IGF-1R in hippocampus of rats with vascular dementia. **Neurosci. lett.**, v.513, n.1, p.20-24, 2012.

GREEN, J.T. The effects of ethanol on the developing cerebellum and eyeblink classical conditioning. **Cerebellum**, v.3, p.178-187, 2004.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Rev. bras. cancerol.**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

GUERRI, C.; BAZINET, A.; RILEY, E. P. Fetal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behavior. **Alcohol alcohol.**, v.44, n.2, p.108–114, 2009

HALLEM, J.S. et al. Spatial correspondence between tactile projection patterns and the distribution of the antigenic Purkinje cell markers anti-zebrin I and anti-zebrin II in the cerebellar folium crus HA of the rat. **Neuroscience**, v.93, p.1083-1094, 1999.

HASHIMOTO, M.; MIKOSHIBA, K. Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the birth date of Purkinje cells. **J. neurosci.**, v.23, p.11342-11351, 2003.

HUANG, J.J. et al. Neuronal oscillations in Golgi cells and purkinje cells are accompanied by decreases in Shannon information entropy. **Cerebellum**, v.13, p.523-526, 2013.

HUANG, Y. et al. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. **Cell.**, v.104, n.5, p.781–790, 2001.

IDRUS, N.M. et al. Administration of memantine during ethanol withdrawal in neonatal rats: effects on long-term ethanol-induced motor incoordination and cerebellar Purkinje cell loss. **Alcohol clin. exp. res.**, v.35, n.2, p.355-364, 2011.

IKONOMIDOU, C.; KAINDL, A. M. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. **Antioxid. redox signal.**, v.14, n.8, p.1535-1550, 2011.

ITO, M. **The cerebellum and neural control**. Raven Press, New York. p.121-130, 1984.

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

JARSKOG, L.F. et al. Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. **The American Journal of Psychiatry**, v.161, p.109-115, 2014.

KARHUNEN, P.J.; ERKINJUNTTI, T.; LAIPPALA, P. Moderate alcohol consumption and loss of cerebellar Purkinje cells. **Br. med. j.**, v.308, p.1663–1667, 1994.

KAWAMOTO, Y. et al. XIAP immunoreactivity in glial and neuronal cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. **Clin. neuropathol.**, v.33, n.1, 76-83, 2013.

KIERNAN, J.A. **Neuroanatomia humana de Barr**. 7.ed. Barueri, SP: Malone, 2003. p.195-213.

KUSHLINSKII, N. et al. Plasma Content of Soluble FAS Antigen in Patients with Adrenal Tumors and Tumor-Like Pathologies. **Bull. exp. biol. med.**, v. 134, n. 2, p. 171-174, 2002.

LACASSE, E.C. Pulling the plug on a cancer cell by eliminating XIAP with AEG35156. **Cancer lett.**, v. 332, n.2, p. 215-224, 2013.

LEE, C. et al. Cerebellar alterations induced by chronic hypoxia: an immunohistochemical study using a chick embryonic model. **Brain res.**, v.901, n.1, p.271-276, 2001.

LEE, Y.; MCKINNON, P.J. Detection of Apoptosis in the Central Nervous System. **Methods mol. biol.**, v.559, p.273-282, 2009.

LIZARTE NETO, F.S. et al. Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. **Braz. j. med. biol. res.**, v.46, p.71-80, 2013.

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

MA, J.; CHEN, B.; XIN, X. XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma. **Eur. j. obst. gynecol. reprod. biol.**, v.146, p. 222–226, 2009.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.49-53, 215-216.

MAIER, S.E.; WEST, J.R. Regional differences in cell loss associate with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. **Alcohol**, v.23, p.49-57, 2001.

MARDONES, J.; SEGOVIA-RIQUELME, N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. **Neurobehav. toxicol. teratol.**, v.5, n.2, p.171-178, 1983.

MARTINELLI JR., C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, v. 52, n.5, p.717-725, 2008.

MIDDLETON, F.A.; STRICK, P.L. Cerebellar outout channels. **Int. rev. neurobiol.**, v.41, p.61-82, 1997.

MIKI, T. et al. Differential effects of neonatal maternal separation on the expression of neurotrophic factors in rat brain. II: Regional differences in the cerebellum versus the cerebral cortex. **Okajimas folia anat. jpn**, v.90, n.3, 53-58, 2013.

MOUSA, A.M. et al. Gestational lead exposure induces developmental abnormalities and up-regulates apoptosis of fetal cerebellar cells in rats. **Drug chem. toxicol.**, p. 1-11, 2014.

MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability, form diseases, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. 1996.

NAPPER, R.M.; WEST, J.R. Permanent neuronal cell loss in the cerebellum of rats exposed to continuous low blood alcohol levels during the brain growth spurt: a stereological investigation. **J. comp. neurol.**, v.362, n.2, p. 283-292, 1995.

NORBURY, C.J.; ZHIVOTOVSKY, B. DNA-damage induced apoptosis. **Oncogene**, v.23, n.16, p. 2797-2808, 2004.

NOVAIS, P.C. et al. Immunohistochemistry Analysis of Proteins Related with Apoptosis as Prognostic Factor in Epidermoid Carcinoma of Penis. **Inter. j. morphol.**, v.30, p.1029-1034, 2012.

NOWOSLAWSKI, L.; KLOCKE, B.J.; ROTH, K.A. Molecular regulation of acute ethanol-induced neuron apoptosis. **J. neuropathol. exp. neurol.**, v.64, n.6, p.490-497, 2005.

OLIVEIRA, S.A. et al. Interaction of maternal separation on the UCh rat cerebellum. **Microsc. res. tech.**, v.77, p.44-51, 2014a.

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, 2014b.

OLNEY, J.W. et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Apoptosis.**, v.5, n.6, p.515-521, 2000.

OLNEY, J.W. et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57Bl/ 6 mouse brain. **Dev. brain res.**, v.133, p.115-126, 2002.

PHILLIPS, S.C.; HARPER, C.G.; KRIL, J. A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. **Brain**, v.110, p.301-314, 1987.

RAPOPORT, M.; VAN REEKUM, R.; MAYBERG, H. The role of the cerebellum in cognition and behavior: a selective review. **J. neuropsychiatry clin. neurosci.**, v.12, n.2, p.193-198, 2000.

REED, J. Mechanisms of Apoptosis. **AJP**, v. 157, n. 5, p. 1415-1429, 2000.

REHM, J. The risks associated with alcohol use and alcoholism. **Alcohol res. health**, v.34, n.2, p.135-143, 2011.

ROBERTS, A.J. et al. μ -Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. **J. pharmacol. exp. ther.**, v.293, p.1002-1008, 2000.

ROGERS, B.P. et al. Reduced fronto-cerebellar functional connectivity in chronic alcoholic patients. **Alcohol clin. exp. res.**, v.36, n.2, p.294-301, 2012.

SAKATA-HAGA, H. et al. Abnormalities of cerebellar foliation in rats prenatally exposed to ethanol. **Acta neuropathol.**, v.102, n.1, p.36-40, 2001.

SARNA, J.R.; HAWKES, R. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. **Prog. neurobiol.**, v.70, p.473-507, 2003.

SCHMAHMANN, J.D. An emerging concept: the cerebellar contribution to higher function. **Arch. neurol.**, v.48, p.1178-1187, 1991.

SEEGER, J.M. et al. Elevated XIAP expression alone does not confer chemoresistance. **Br. j. cancer.**, v.102, p.1717-1723, 2010.

SILLITOE, V.R.; JOYNER, A.L. Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. **Annu. rev. cell dev. biol.**, v.23, p.549-577, 2007.

SILVA, B.P.F. et al. Efeitos da exposição perinatal à aguardente sobre o córtex cerebral de ratos. **Rev. para. med.**, v.20, n.1, p.7-14, 2006.

SUZANNE, M.; KRIL, J.J. Human alcohol-related neuropathology. **Acta neuropathol.**, v.127, n.1, p.71-90, 2014.

TARANUKHIN, A.G. et al. Neuroprotection by taurine in ethanol-induced apoptosis in the developing cerebellum. **J. biomed. sci.**, v.17, n.12, p.1-11, 2010.

TIRAPELLI, L.F. et al. Caspase-3 and Bcl-2 expression in glioblastoma. An immunohistochemical study. **Arq. neuro-psiquiatr.**, v.68, p.603-607, 2010.

TONG, Q.S. et al. Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. **Cancer gene ther.**, v.12, n.5, p.509-514, 2005.

TORVIK, A.; TORP, S. The prevalence of alcoholic cerebellar atrophy. A morphometric and histological study of an autopsy material. **J. neurol. sci.**, v.75, p.43–51, 1986.

TURCATEL, E.; FUNCHAL, C.S.; GOMEZ, R. Alterações comportamentais e de estresse oxidativo no sistema nervoso central pelo uso de álcool e tabaco. **Rev. neurocienc.**, [s.n.], p.1-11, 2012.

VAN SKIKE, C.E. et al. Behavioral Effects of Ethanol in Cerebellum Are Age Dependent: Potential System and Molecular Mechanisms. **Alcohol.clin. exp. res.**, v.34, p.2070–2080, 2010.

VICTOR, M.; ADAMS, R.; MANCALL, E.L. A restricted form of cerebellar cortical degeneration occurring in alcoholic patients. **Arch. neurol.**, v.1, p.579–688, 1959.

VOOGD, J. The human cerebellum. **J. chem. neuroanat.**, v.26, p.243-252, 2003.

VOOGD, J.; GLICKSTEIN, M. The anatomy of the cerebellum. **Trends neurosci.**, v.21, p.370-375, 1998.

WHITE, M.; MCCUBREY, J. Supression of Apoptosis: role in cell growth and neoplasia. **Leukemia**, v. 15, p.1011-1021, 2001.

WILKINSON, J.C. et al. Upstream Regulatory Role for XIAP in Receptor-Mediated Apoptosis. **Mol. cell. biol.**, v.24, n.16, p.7003–7014, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol and health. Geneva, 2014. Disponível em: (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf?ua=1). Acesso em: 07 abr. 2015.

YOUNG, C. et al. Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. **Cell death differ.**, v.10, p.1148-1155, 2003.

ZEEUW, P. et al. Prenatal exposure to cigarette smoke or alcohol and cerebellum volume in attention-deficit/hyperactivity disorder and typical development. **Translational Psychiatry**, v.84, p.1-9, 2012.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed. **Pharmacol. ther.**, v. 92, n.1, p. 57-70, 2001.

Apoptosis of Purkinje and Granular Cells of the Cerebellum Following Chronic Ethanol Intake

Suelen A. Oliveira · Luiz Gustavo A. Chuffa · Beatriz Aparecida Fioruci-Fontanelli ·
Fermio Sanches Lizarte Neto · Paulo Cezar Novais · Luiz Fernando Tirapelli ·
Jorge Camargo Oishi · Luiz Fernando Takase · Maira Aparecida Stefanini ·
Marcelo Martinez · Francisco Eduardo Martinez

© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Ethanol alters motricity, learning, cognition, and cellular metabolism in the cerebellum. We evaluated the effect of ethanol on apoptosis in Golgi, Purkinje, and granule cells of the cerebellum in adult rats. There were two groups of 20 rats: a control group that did not consume ethanol and an experimental group of UChA rats that consumed ethanol at 10 % (<2 g ethanol/kg body weight/day). At 120 days old, rats were anesthetized and decapitated, and their cerebella were collected and fixed. Cerebellar sections were subjected to immunohistochemistry for terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), caspase-3, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), and insulin-like growth factor 1-receptor (IGF-1R); real-time PCR (RT-PCR) to determine caspase-3, XIAP, and IGF-1R gene expression; and transmission electron microscopy (TEM). We identified fragmentation of DNA and an increase in caspase-3 protein and XIAP in

Purkinje cells, whereas granule cells exhibited increased caspase-3 and XIAP. IGF-1R expression was unchanged. There was no significant difference in gene expression of caspase-3, XIAP, and IGF-1R. There were an increase in lipid droplets, a reduction in the cellular cytoplasm in electron-dense nuclei, and changes in the myelin sheath in the cerebellar cortex. In conclusion, our data demonstrated that ethanol induced apoptosis in the Purkinje and granule cells of the cerebellum of adult UChA rats.

Keywords Apoptosis · XIAP · IGF-1R · Caspase-3 · Cerebellum · UChA rats

Introduction

Alcoholism affects millions of people worldwide. It is characterized by the excessive consumption of ethanol and is associated with various health risks. It is a multifactorial syndrome that leads to physical, mental, and social impairments [1, 2]; alters the structure and function of the brain; and in some cases, can lead to neurodegeneration [3].

Prenatal exposure to ethanol decreases cerebral volume. In the cerebellum, where a stronger reduction occurs, prenatal exposure leads to the degeneration of cognitive and behavioral functions [4]. Throughout its development, the cerebellum is extremely sensitive to high exposure to ethanol, which causes impairment in Purkinje and granule cells and in glia [5, 6]. Purkinje cells are the dominant elements involved in the processing of cerebellar information [7]. Golgi cells contribute to information processing during information input to the cerebellar cortex. Purkinje cell dysfunction can damage motor coordination [8, 9], and Purkinje cells are susceptible to damage from ethanol [10–12].

S. A. Oliveira
Graduate Program in General and Applied Biology, Institute of
Bioscience, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu,
SP 18618-970, Brazil

L. G. A. Chuffa · B. A. Fioruci-Fontanelli · F. E. Martinez (✉)
Department of Anatomy, Institute of Biosciences, Univ. Estadual
Paulista (UNESP), P.O. Box 510, Rubião Júnior, s/n, Botucatu,
SP 18618-970, Brazil
e-mail: martinez@ibb.unesp.br

F. S. L. Neto · P. C. Novais · L. F. Tirapelli
Department of Surgery and Anatomy, Faculty of Medicine, Univ.
São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

J. C. Oishi
Department of Physiology, Universidade Federal de São Carlos,
São Carlos, SP 13565-905, Brazil

L. F. Takase · M. A. Stefanini · M. Martinez
Department of Morphology and Pathology, Universidade Federal de
São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

There are two main pathways leading to apoptosis: an extrinsic pathway, which activates caspase-8, and an intrinsic pathway, which culminates in the cleavage and activation of procaspase-3. Activation of caspase-3 produces morphological changes typical of apoptosis [13, 14]. Although the apoptotic pathway has been extensively studied in the cerebellum, no studies have identified alterations in apoptosis in ethanol-preferring rats treated with different volumes of ethanol or durations of exposure.

Insulin-like growth factors (IGFs) are a family of mitogenic proteins involved in the regulation of cell growth and differentiation, and insulin-like growth factor 1-receptor (IGF-1R) plays a critical role in the regulation of cognitive and motor functions for various cell types in the central nervous system (CNS) [15]. Caspase-3 and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) are involved in ethanol-induced apoptosis. Caspase-3 is linked to the effector phase of programmed cell death, promoting the expression of restriction endonucleases that cleave DNA. XIAP plays an antiapoptotic role by inhibiting the effector caspases, caspase-3 and -7, and the initiator caspase, caspase-9, which modulates the transcription factor—nuclear factor-kappa β (NF- κ B). Such proteins are therefore markers of the signaling mechanisms that, once changed, can lead to neurological deficits [16].

UChA and UChB rats are voluntary ethanol consumers and originate from a colony of Wistar rats developed at the University of Chile (UCh) 70 generations ago [17–19]. These rats comprise one of the best models for studying the effects of ethanol consumption on several physiological systems and, furthermore, represent the context of alcoholism-related pathologies (e.g., dependence or abstinence syndrome) such as those found in human diseases. Our aim was to evaluate apoptosis in Golgi, Purkinje, and granule cells of the cerebellum of adult UChA rats.

Materials and Methods

Animals

Sixty adult male rats were provided by the Department of Anatomy (Biosciences Institute, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brazil). They were individually housed in polypropylene cages with laboratory-grade pine shavings as bedding and were kept under controlled room temperature (23 ± 1 °C) and lighting conditions (12-h light/dark photoperiod, lights on at 6 a.m.). The UChA rats (a model of ethanol-preferring rats, developed by selective breeding) have a spontaneous genetic propensity to voluntarily consume 10 % (v/v) ethanol (<2 g ethanol/kg body weight/day). At 15 days old, 40 UChA rats were provided two bottles for consumption over a 15-day period: one bottle containing water ad libitum (1) and another containing a 10 % (v/v)

ethanol solution (2). After this 15-day period, 20 rats from each group showing ethanol consumption lower than 2.0 g ethanol/kg of body weight/day were selected, according to the protocol of Mardones and Segovia-Riquelme [20]. In the rats selected for this study, the preference ratio associated with ethanol-seeking behavior was approximately 65 %. The rats were then divided into two groups: the UChA group ($n=20$), consisting of rats provided a 10 % (v/v) ethanol solution ad libitum (free choice for water or ethanol), drinking between 0.1 to 2 g ethanol/kg body weight/day, and a control group ($n=20$) consisting of rats without access to ethanol. From the beginning of the experiment (65 days old) to euthanasia (120 days old), the UChA rats consumed 10 % (v/v) ethanol over the course of 55 days (Fig. 1). All animal procedures were approved by the Biosciences Institute, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Institutional Animal Care and Use Committee.

Electron Microscopy

Four rat cerebellar samples were collected from each group using a 21-gauge needle, following an intracardiac perfusion with 2.5 % glutaraldehyde in 0.10 M sodium phosphate buffer. Samples were immersed in the same fixative for a minimum of 3 h, postfixed in 1 % osmium tetroxide in 0.10 M phosphate buffer for 1 h, and stained en bloc in 3 % uranyl acetate for 1 h. Samples were dehydrated in ethanol, embedded in epoxy resin (Sigma-Aldrich), sectioned at 50 to 60 nm on a Leica UCT ultramicrotome, and picked up on carbon-coated copper grids. Sections were stained with 3 % uranyl acetate for 5 min and Sato's lead stains for 1 min. Grids were viewed using a Philips CM 100 transmission electron microscope (TEM).

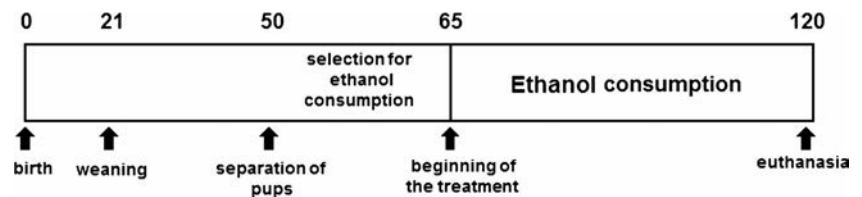
Immunohistochemistry of Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

Apoptotic cells were analyzed in samples from five rats from each group using a FragELTM DNA kit (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The slides were counterstained with Harris hematoxylin and assembled with Permount. Negative controls were treated in the same way but were incubated without the TdT enzyme.

Immunohistochemistry of Caspase-3, XIAP, and IGF-1R

Sections of the cerebellum of the rats were fixed by immersion in 4 % paraformaldehyde and embedded in paraffin. Cuts at a thickness of 3 μ m were obtained using a Reichert Jung 2040 microtome. Antigen recovery was performed in citrate buffer at 10 mM, pH 6.0 for 40 min, after being incubated in 3 % hydrogen peroxide in order to block endogenous peroxidase activities. The cuts underwent preincubation for 30 min in

Fig. 1 Schematic representation of the overall experimental period from birth until the selection period for ethanol preference



serum-blocking solution (1 % bovine serum albumin), and to block nonspecific binding, Background Sniper, Biocare Medical (Polymer Kit: Mach 4 Universal HRP) was used.

To mark caspase-3, we used caspase-3 polyclonal activated antibodies (CPP32, monoclonal lyophilized, Novocastra®) and XIAP (SC-11426 polyclonal, Santa Cruz®) diluted at 1/200 in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS). For incubation of IGF-1R, we used N-20 rabbit primary polyclonal antibody (SC-720, polyclonal, Santa Cruz®) at 1/50 dilution in 0.01 M PBS solution with 3 % bovine serum albumin (BSA). The reactions were detected using Betazoid DAB (BDB900G5) chromogen diluted in Betazoid DAB substrate buffer (DS900L) from the Mach 4 kit. Samples used as positive controls were the encephala of rats subjected to ischemia. The sections were stained with diaminobenzidine for 10 min at room temperature and then counterstained with hematoxylin-eosin and assembled in resin.

The slides were analyzed using a Zeiss® microscope, model Axioskop 2 plus, with a camera (Axio Cam Hrc®) attached. Axio Vision 4.6® software with $\times 400$ magnification was used for the analysis. The number of positive cells in each group was counted using ten nonoverlapping high random fields and counts are reported as group averages.

Real-Time PCR for Caspase-3, XIAP, and IGF-1R Gene Expression

Cerebellum samples were frozen at -80°C . After extracting the RNA using the reactant Trizol® (Invitrogen, EUA), RNA was separated, quantified, and analyzed for integrity in agarose gel. To synthesize complementary DNA (cDNA), we performed a reverse transcription using a commercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA) kit, according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed using an ABI PRISM 7500 Fast Real Time PCR System and FAM™ dyes (Applied Biosystems, Contraboeuf, France), following the manufacturer's protocols, in our genomics facility. The caspase-3 (Rn00563902_m1), IGF-1R (Rn00583837_m1), and XIAP (Rn00573706_m1) genes used were from the TaqMan Assay-on-Demand system, which is comprised of oligonucleotides and probes acquired from Applied Biosystems. Amplification was carried out in a final volume of 10 μL , using 5 μL of the specific reactant TaqMan Master

Mix (Applied Biosystems), 0.5 μL of each specific probe, and 4.5 μL of cDNA. All reactions were performed in duplicate and analyzed using a real-time PCR detection device (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems). Data were collected constantly during PCR and analyzed using the ABI-7500 SDS software package.

Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SD. Differences between groups were compared by unpaired *t* test and Mann-Whitney test. Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$ (*P* value: two-tailed). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software.

Results

Electron Microscopy

The images of cerebella displayed dilation of the endoplasmic reticulum, an increase in lipid droplets, and electron density in the nuclei of UChA rats. Furthermore, there was a severe reduction in the medullary body of the cerebellum indicating disruption of myelin in UChA rats (Fig. 2d–i).

Immunohistochemistry Using TUNEL, Caspase-3, XIAP, and IGF-1R

All of the Purkinje, granular, and Golgi cells exhibited apoptosis in both UChA (Fig. 3b, d) and control rats (Fig. 3a, c), but were most evident in UChA rats. While a strong reaction to XIAP was observed in the Purkinje and granular cells of the UChA rats (Fig. 3e), a positive reaction to IGF-1R was not observed (Fig. 4a, b).

The count for Golgi cells positive for TUNEL and caspase-3 did not differ significantly (Figs. 5a and 6a), but the number of XIAP-positive cells was lower in the UChA rats than in controls (Fig. 7a). Purkinje cells positive for TUNEL, caspase-3, and XIAP were more frequent in the UChA rats (Figs. 5b, 6b, and 7b). Granular cells positive for caspase-3 and XIAP were more frequent in the UChA rats (Figs. 6c and 7c), but there was no difference in TUNEL (Fig. 5c).

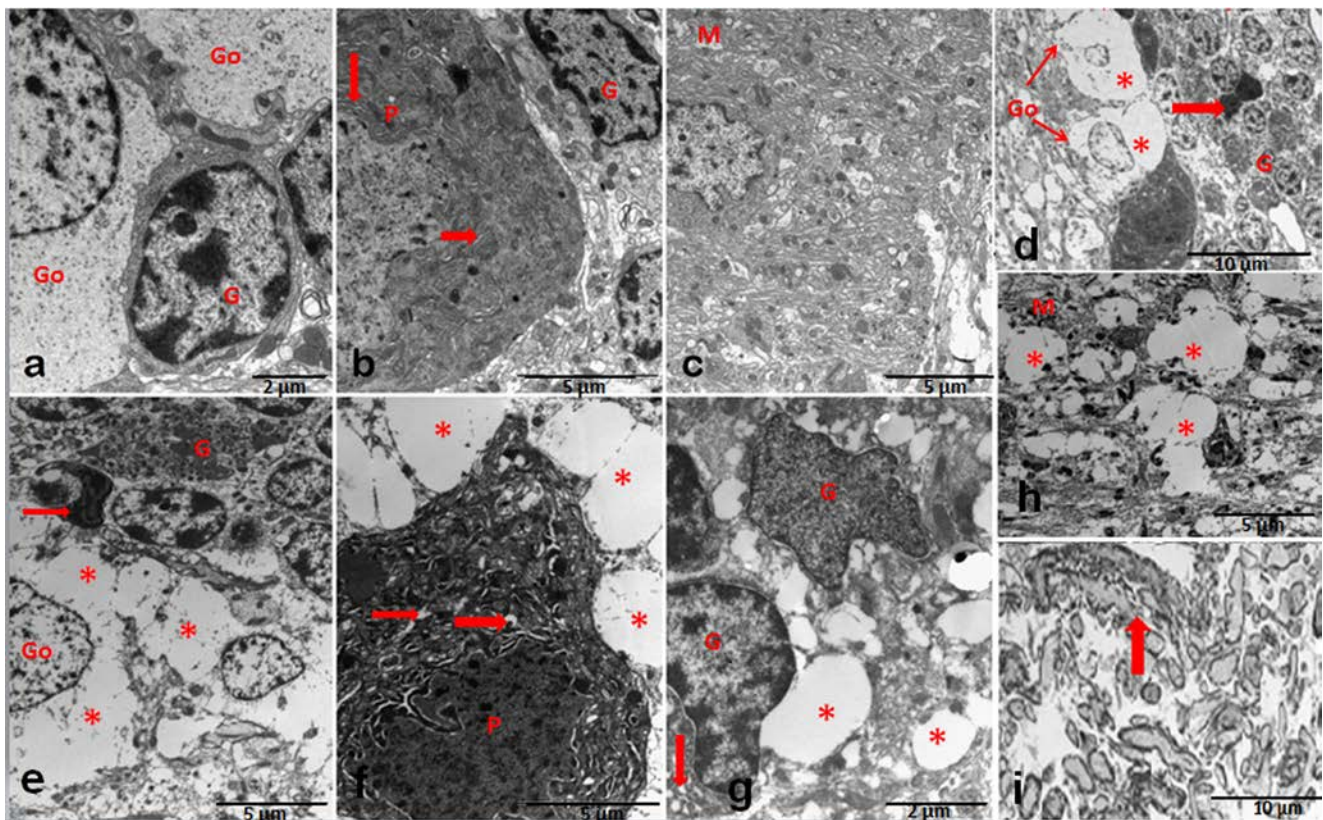


Fig. 2 a–i TEM micrographs of the cerebellum of control (a–c) and UChA (d–i) rats. **a** Normal Golgi (*Go*) and granular (*G*) cells. **b** Granular (*G*) and Purkinje (*P*) cells. Note the Purkinje cell with normal cisterns of the endoplasmic reticulum (*arrows*). **c** Molecular layer with a typical arrangement (*M*). **d** Golgi with cytoplasmic edema (*Go*) and lipid droplets (*asterisks*) and granular cells (*G*) with pyknotic nuclei (*arrows*). **e** Magnified view of Golgi cells (*Go*) with intense accumulation of lipid droplets

(*asterisks*) and the granular layer (*G*) with pyknotic nuclei (*arrow*). **f** Purkinje cell with electron-dense nuclei (*P*) and lipid droplets (*asterisks*). Note dilated cisterns of the endoplasmic reticulum (*arrows*). **g** Granular layer (*G*) with intense lipid droplets (*asterisks*) and dilated cisterns of the endoplasmic reticulum (*arrow*). **h** Severe lipid droplet accumulation (*asterisks*) in the molecular layer (*M*). **i** Disorganization of the medullary body of the cerebellum with changes in the myelin sheath (*arrow*)

Expression of Caspase-3, XIAP, and IGF-1R

Gene expression of caspase-3, XIAP, and IGF-1R was unchanged in the presence of ethanol, suggesting posttranslational modifications to these target proteins (Fig. 8a–c).

Discussion

Apoptosis in the cerebellar cortex of rats was observed using electron microscopy, immunohistochemistry to detect caspase-3 and XIAP, and the TUNEL method. Gene expression of caspase-3 and XIAP, as well as of IGF-1R, underwent changes upon ethanol use, which led to the damage of structures necessary for normal cerebellar function [21]. Changes in the chain of apoptotic events can lead to malformations and pathological conditions, including cancer, autoimmune disorders, and neurodegenerative diseases [15, 22].

The ultrastructure of the cerebellum in the UChA rats showed signs of cellular death typical of ethanol toxicity. A

previous work carried out with UChA rats also demonstrated alterations in cerebellar structure, arising from changes to the Purkinje neurons [23]. For example, Lewandowska and colleagues [24] showed similar findings during pregnancy, observing degenerative changes in Purkinje and granule cells. Jaatinen and Rintali [10] reported that in adult rats, chronic exposure to ethanol leads to cerebellar atrophy. The main neuropathological features of this atrophy included loss of Purkinje cells and a decrease in the volume of the Purkinje cell dendritic network in the molecular layer. Ethanol leads to stress as well as persistent hepatic lesions and hepatic steatosis, promoting lipolysis and increasing toxic lipids. Of these toxic lipids, ceramides exacerbate hepatic lesions, causing insulin resistance, oxidative stress, and activation of pro-inflammatory cytokines. Once they are released to the peripheral blood, they cross the blood-brain barrier and initiate a complex sequence of neurodegeneration. Insulin resistance leads to neural impairments and damages the function of oligodendrocytes, leading to myelin degradation, which then causes an increase in the production of toxic lipids in the CNS. In addition, the direct neurotoxic effects caused by ethanol and

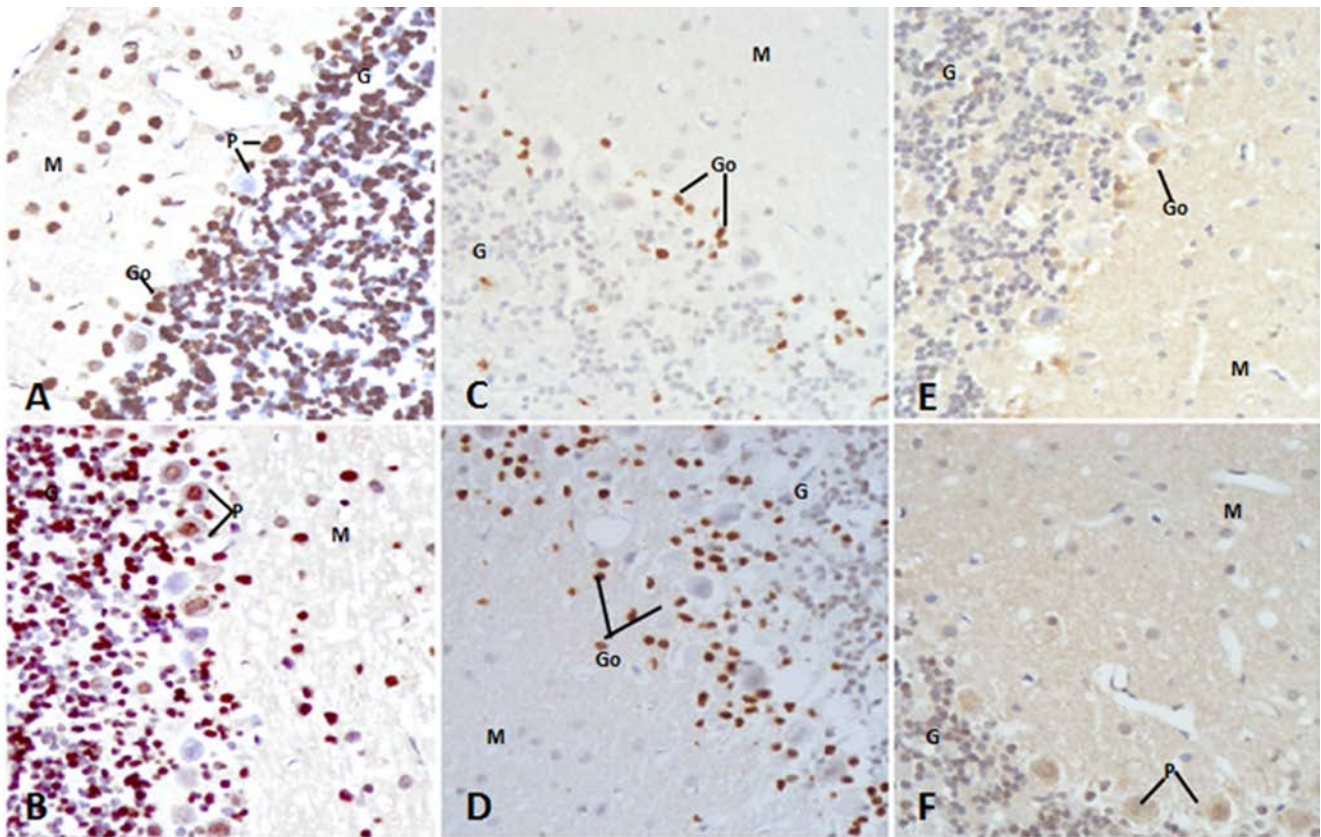


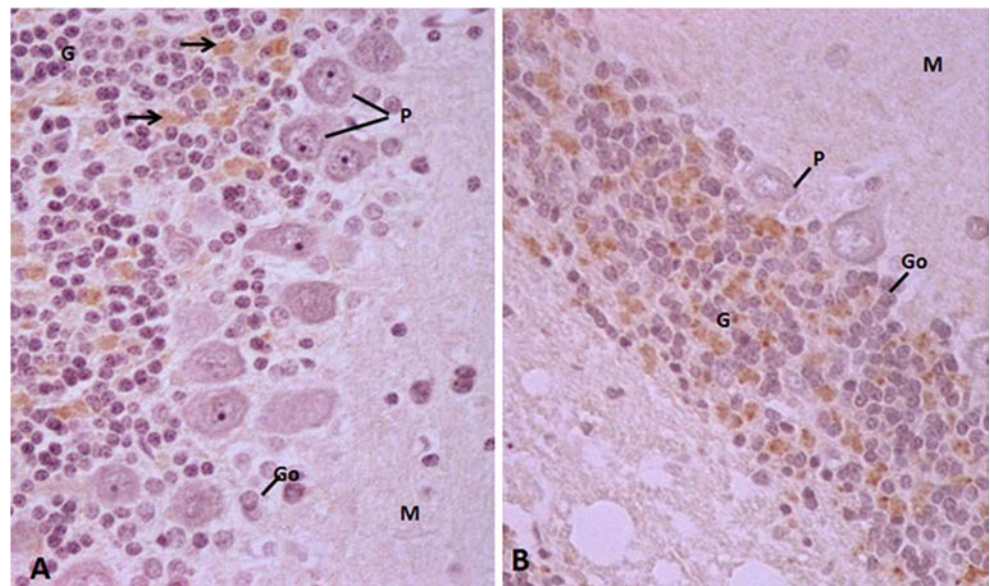
Fig. 3 a–f Representative immunohistochemistry of the cerebellar cortex: molecular layer (*M*), Purkinje cells (*P*), and granular cells (*G*) at $\times 400$ magnification. **a** Purkinje marked and unmarked (*P*) in control TUNEL. **b** Purkinje cells (*P*) in TUNEL UChA. **c** Golgi neurons (*Go*) and caspase-3

in the control group. **d** Granular (*G*) and Golgi neurons (*Go*) in caspase-3 UChA. **e** Golgi neurons (*Go*) in control XIAP. **f** Purkinje (*P*) and granular (*G*) cells in XIAP UChA

its metabolites impair mitochondrial function and reduce the integrity of the membrane. This diminishes messenger RNA associated with myelin, which responds to insulin and increases the apoptosis index, oxidative stress, lipid

preoxidation, damage to DNA, and disruption of acetylcholine homeostasis, contributing to neurodegeneration [15]. Chronic ethanol consumption causes imbalances in neuronal calcium homeostasis resulting in dilation of the smooth

Fig. 4 a, b Immunohistochemical images at $\times 400$ magnification of the cerebellum of **a** control and **b** UChA rats. *Arrows* show a strong positive reaction to IGF-1R in glomerular areas



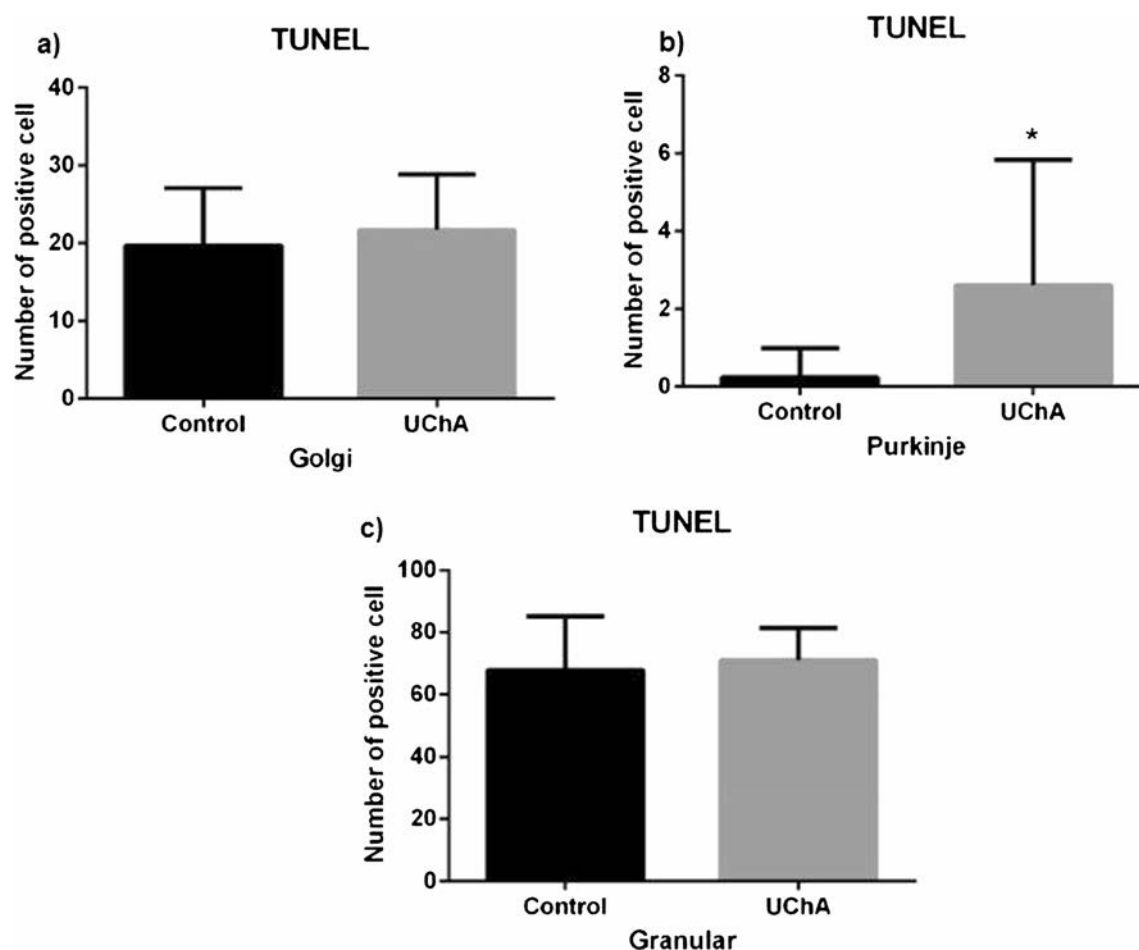


Fig. 5 a–c Immunohistochemical analysis of apoptosis (TUNEL) in a Golgi, b Purkinje, and c granular cells. Positive cells were counted in ten random fields (mean±SD). * $P < 0.05$, Student's t test, $n = 5$ rats/group

endoplasmic reticulum (SER) in Purkinje neurons of aged rats, which is accompanied by neuronal death or axonal apoptosis. The SER stores calcium, essential for neuronal functioning [25]. Dilation of the SER in Purkinje cells was observed in adult rats after 40 weeks of ethanol consumption and led to degeneration of terminal dendritic segments [26–29]. Inducers of endoplasmic reticulum stress (e.g., ethanol) cause apoptotic morphological changes through activation of caspase-3 [30]. These findings, including increased caspase-3, were identified in UChA rats.

Caspase-3 is increased in Purkinje and granule cells and, when activated, is responsible for broad spectrum proteolytic cleavage in cellular targets, leading to cellular death [31]. In this study, the DNA fragmentation analysis indicated expressive marks in the Purkinje neurons, similar to that found by Taranukhin and colleagues [32]. The cerebellum is particularly vulnerable to the effects of ethanol during the first 10 days of life, with ethanol inducing loss of Purkinje and granule cells. Neuronal death during this period is independent of how ethanol is administered. Conversely, granule cells are more sensitive to ethanol than Purkinje cells, showing a 20 % reduction in cells when blood alcohol concentrations are lower

than 150 mg/dL. The equivalent reduction is only found in Purkinje neurons at an ethanol concentration of 300 mg/dL or higher. Although some researchers have suggested that the loss of granule cells is secondary to the death of Purkinje neurons, there is evidence that ethanol causes the death of granule neurons directly. Chronic exposure to ethanol causes degeneration in the dendrites of Purkinje cells and their synapses in the molecular layer. Furthermore, granular cells and molecular layer interneurons are the most vulnerable cerebellar structures to ethanol toxicity in adult animals. The basic mechanisms underlying these ethanol-induced functional alterations and the related neuropathology in the cerebellum include excitotoxicity; dietary factors, especially thiamine depletion; glial abnormalities; changes in growth factors; apoptotic mechanisms; oxidative stress; and compromised energy production [10].

The inhibitors of apoptosis protein family (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) are anti-apoptosis proteins that inhibit the activity of effector caspase-3 and caspase-7 as well as the initiator caspase-9. They also modulate the NF- κ B transcription factor. An example member of this family is the XIAP protein. IAPs are removed by this protein, which is

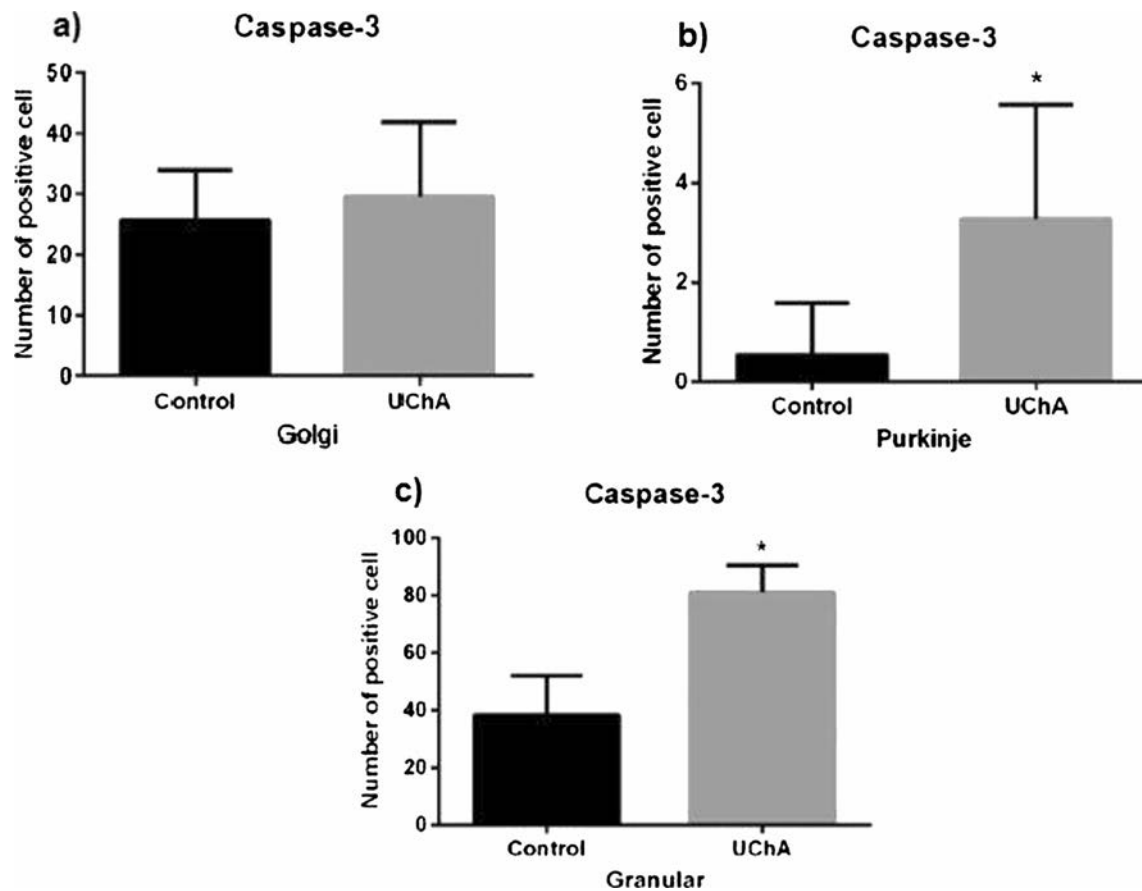


Fig. 6 a–c Immunohistochemical analysis of caspase-3 in a Golgi, b Purkinje, and c granular cells. Positive cells were counted in 10 random fields (mean±SD). * $P<0.05$, Student's t test, $n=5$ rats/group

released by the mitochondrial protein second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI (Smac/DIABLO). After mitochondrial damage, Smac/DIABLO is released from the intermembrane space into the cytoplasm, along with cytochrome c , promoting apoptosis. Cytochrome c links itself to the apoptotic protease activating factor 1 (APAF-1) and directly activates caspase-9, whereas Smac/DIABLO removes the IAPs from their inhibitory interactions with the caspase [16]. Our results demonstrated that XIAP acts as an antiapoptotic element in Purkinje and granule neurons of UChA rats. In control rats, XIAP expression was only high in Golgi neurons displaying no apoptosis. This can be explained by the fact that this rat model has developed new strategies to avoid neuronal cell death in the presence of a minimum amount of ethanol during the period for ethanol preference. Lee and colleagues [33] found similar results where ethanol intake promoted high expression of cell survivor-related genes such as XIAP, Bcl-xL, and catalase. Although in the liver of mice, alcohol intake increased expression of p53, Omi/HtrA2, Bcl-2, and Bax without affecting XIAP expression or the Bcl-2/Bax ratio [34], Antonio and colleagues [35] demonstrated that ethanol-treated fetal rhombencephalic neurons showed reduced XIAP and Bcl-2

gene expression (prosurvival genes) with high caspase-3 activity and reactive oxygen species formation. Notably, therapy with lipoic acid exerted a neuroprotective effect. To date, the mechanism by which ethanol modulates XIAP expression remains unclear.

There were no markers identified for IGF-1R in the cerebellar cortex, which may be due to the age of the rats [36]. Bondy [37] reported that IGF-1 is abundant in Purkinje cells and develops synaptic stations. It may play an important role in both the formation and myelination of specific synaptic connections.

In the long term, ethanol could change gene expression related to myelination, apoptosis, cellular adhesion, neurogenesis, and neural disease [38]. Genes that are frequently super-expressed by ethanol actions codify heat-shock proteins (HSPs), which are related to synaptic transmission and plasticity. Ethanol diminishes gene expression related to myelination and to protein synthesis [39], thus corroborating our findings for changes to the myelin sheath in the medullary body of the cerebellum.

Despite not reaching a significant level, there was an apparent change in gene expression that regulated caspase-3 in the UChA group and XIAP in the control group. An increase

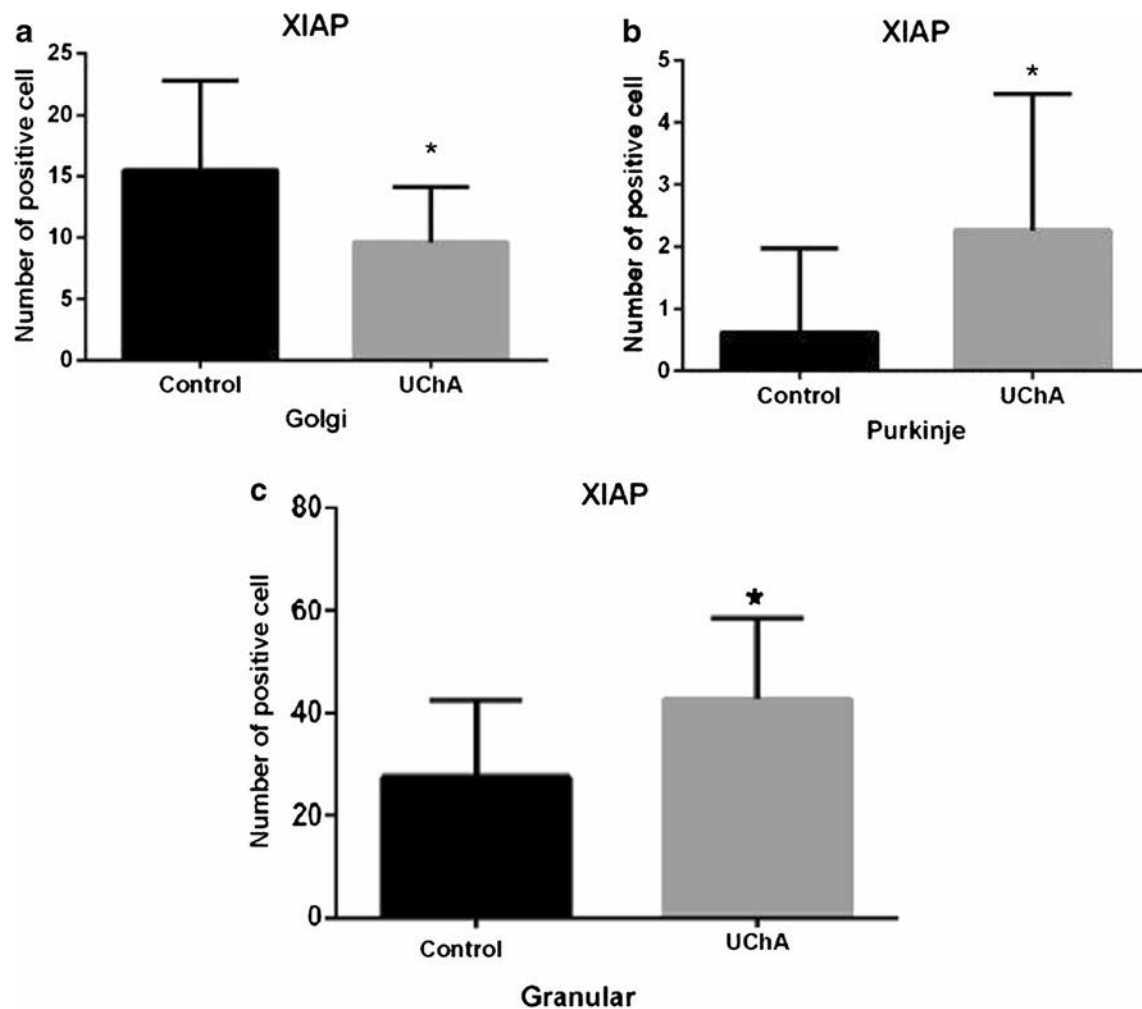


Fig. 7 a–c Immunohistochemical analysis of XIAP in a Golgi, b Purkinje, and c granular cells. Positive cells were counted in 10 random fields (mean \pm SD). * $P < 0.05$, Student's *t* test, $n = 5$ rats/group

in cellular reactive oxygen species (ROS) can activate several classes of genes, including those that are dependent on NF- κ B, that bind to the antioxidant response element (ARE). Because XIAP, Bcl-XL, or catalase can be regulated by NF- κ B-dependent mechanisms and because catalase also has an antioxidant response element that can bind to Nrf2, it is likely that this initial ethanol-associated augmentation of gene expression is mediated by the effects of increased ROS on ROS-sensitive transcription factors [33]. Homeostasis is maintained by controlling the balance between antiapoptotic and proapoptotic proteins. Stimuli such as DNA damage triggered by chronic ethanol consumption can lead to an increase in the expression of proapoptotic proteins, and this imbalance induces apoptosis [16]. This was supported by the observation of caspase-3 markers in the Purkinje and granule neurons of the UChA group.

IGF-1R regulator of gene expression was more evident in the control group. Ethanol decreased the production of IGF in rats and in cerebellar neural cell cultures, and we measured signs of insulin-stimulated cerebellar hypoplasia. In addition,

Purkinje and granule cell populations in the cerebellum were reduced by ethanol exposure during development. Growth factors regulate the cellular cycle. It has been shown that ethanol increases time in G1, delaying the cellular cycle and diminishing the amount of proliferating cells [40]. Our results showed a decrease in the regulator gene of the IGF-1R in the UChA, corroborating findings previously published by Ewencyk and colleagues [21].

The clinical symptoms of ethanol abuse can be confused with age-related neuropathy in human patients. However, prolonged ethanol consumption significantly decreases the number of synaptic connections of Purkinje neurons [41] as well as the activity of granule cells by increasing inhibitory GABAergic transmission from Golgi cells [42].

The cerebellum controls motor coordination, balance, muscle tone, motor learning, and cognition. These functions are partly mediated by neurons in the cerebellar cortex, which receives excitatory input from the somatosensory system and the cerebral cortex. These excitatory inputs are relayed by glutamatergic mossy fibers originating in the brain stem and

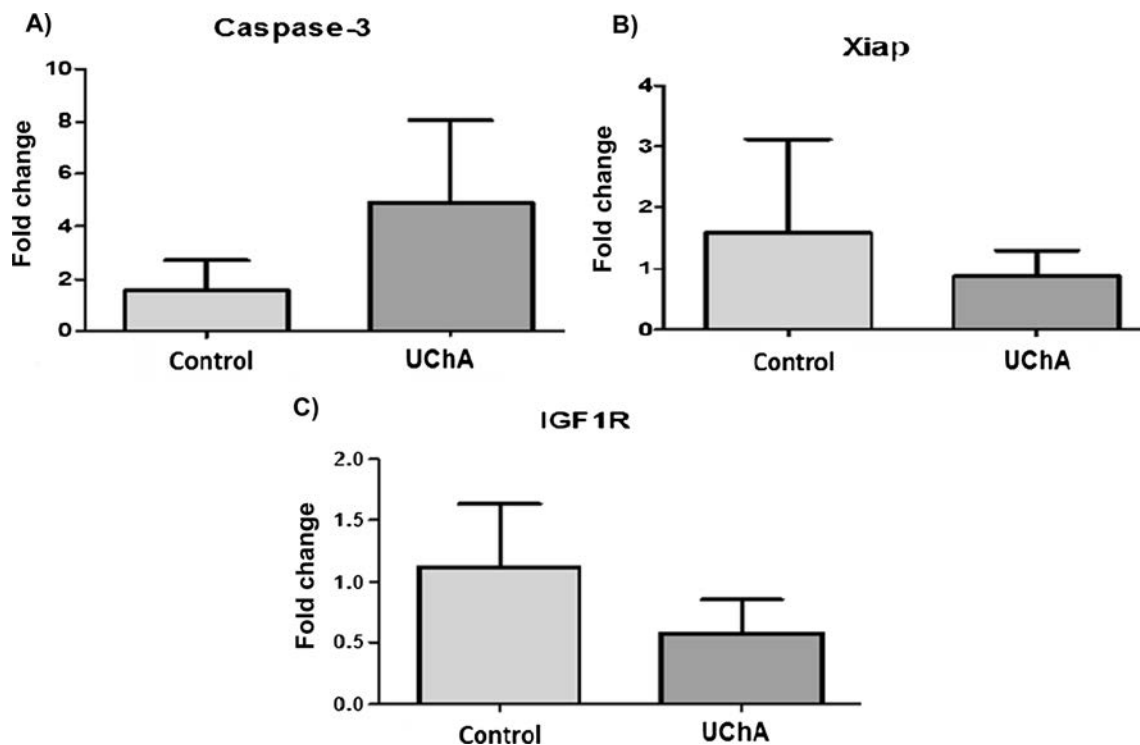


Fig. 8 a–c Gene expression analysis of a caspase-3, b XIAP, and c IGF-1R in the cerebellar cortex. Mean±SD, * $P < 0.05$, Student's *t* test, $n = 6$ rats/group

spinal cord. A single mossy fiber makes synaptic connections with hundreds of granule cells, and thousands of these cells provide excitatory input to Purkinje neurons. The activity of granule cells is regulated by GABAergic inhibitory input provided by a specialized interneuron, the Golgi cell. The Golgi cell axon forms a complex plexus that connects with thousands of granule cell dendrites in glial-ensheathed glomeruli also containing mossy fibers. Golgi cells receive excitatory inputs from mossy fibers, granule cell axons (parallel fibers and ascending axons), and climbing fibers. Inhibitory inputs are provided by molecular layer interneurons and perhaps Purkinje cells [43]. Furthermore, Botta and colleagues [44] identified a novel effect of ethanol on Golgi cell physiology that involves reduced activity of a feedback mechanism that normally results in a transient decrease in GABAA receptor-mediated inhibition of granule cells. This effect may contribute to the decrease in granule cell responsiveness to mossy fiber input that is observed during acute ethanol exposure. Although ethanol intoxication is associated with cellular damage of cerebellar cortical circuits, which results in complex motor and cognitive alterations, our results demonstrate that these alterations may be caused, in part, by ethanol-induced apoptotic cell death.

Thus, we evaluated the ethanol injury to the cerebellum of animals and humans at different ages and in different forms of exposure. The action of neuroprotective substances (e.g., taurine, vitamin E, beta-carotene,

resveratrol) can minimize the impact of ethanol in the cerebellum [32, 45–47].

Conclusion

Ethanol causes apoptosis of Purkinje and granule cells in the cerebellum of adult rats by modulating the expression of proteins associated with the apoptotic pathway. Further investigations are required to investigate how neural lesions induced by ethanol consumption interfere with cerebellar connections to other cortical regions during the performance of motor, behavioral, and cognitive functions.

Acknowledgments We would like to thank Mr. Wanderley Thiago da Silva for animal care, Mr. Gelson Rodrigues for technical support and the funding agency (FAPESP 2011/50466-0).

Conflict of Interest The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Edwards G, Gross MM. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. *BMJ*. 1976;1:1058–61.
2. World Health Organization. Global status report on alcohol and health. Geneva: WHO Press; 2011. p. 1–85.

3. Alfonso-Loeches S, Guerri C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011;48:19–47.
4. De Smet HJ, Parquier PF, De Deyn PP, Marie P. The cerebellum and neurocognition: a review of clinical and neuroimaging studies. *AJCN.* 2010;4:1.
5. Maier SE, West JR. Regional differences in cell loss associate with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcohol.* 2001;23:49–57.
6. Sakata-Haga H, Sawada K, Hisano S, Fukui Y. Abnormalities of cerebellar foliation in rats prenatally exposed to ethanol. *Acta Neuropathol.* 2001;102(1):36–40.
7. Apfel MI, Esberard CA, Rodrigues FK, Bahamad Jr FM, Sillero RO. Stereological study of the cerebellar Purkinje cells submitted to alcoholic intoxication in Wistar rats. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002;60:258–63.
8. Ito M. The cerebellum and neural control. New York: Raven; 1984. p. 121–30.
9. Huang JJ, Yen CT, Tsao HW, Tsai ML, Huang C. Neuronal oscillations in Golgi cells and purkinje cells are accompanied by decreases in Shannon information entropy. *Cerebellum.* 2013;13:523–6.
10. Jaatinen P, Rintala J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. *Cerebellum.* 2008;7:332–47.
11. Luo J. Mechanisms of ethanol-induced death of cerebellar granule cells. *Cerebellum.* 2012;11:145–54.
12. Sarna JR, Hawkes R. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol.* 2003;70:473–507.
13. Young C, Klocke BJ, Tenkova T, Choi J, Labruyere J, Qin Y-Q, et al. Ethanol-induced neuronal apoptosis *in vivo* requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death Differ.* 2003;10:1148–55.
14. Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Labruyere J, Qin YQ, Ikonomidou C. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. *Dev Brain Res.* 2002;133:115–26.
15. De La Monte SM, Longato L, Tong M, DeNucci S, Wands JR. The liver-brain axis of alcohol-mediated neurodegeneration: role of toxic lipids. *Int J Environ Res Public Health.* 2009;6:2055–75.
16. Grivicich I, Regner A, Da Rocha AB. Morte celular por apoptose apoptosis: programmed cell death. *Rev Bras Cancerol.* 2007;53:335–43.
17. Quintanilla ME, Israel Y, Sapag A, Tampier L. The UChA and UChB rat lines: metabolic and genetic differences influencing ethanol intake. *Addict Biol.* 2006;11:310–23.
18. Chuffa LG, Amorim JP, Teixeira GR, Mendes LO, Fioruci BA, Pinheiro PF, et al. Long-term exogenous melatonin treatment modulates overall feed efficiency and protects ovarian tissue against injuries caused by ethanol-induced oxidative stress in adult UChB rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011;35:1498–508.
19. Chuffa LG, Seiva FR, Fávares WJ, Amorim JP, Teixeira GR, Mendes LO, et al. Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. *Reprod Toxicol.* 2013;39:40–9.
20. Mardones J, Segovia-Riquelme N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1983;5:171–8.
21. Ewencyk A, Ziplow J, Tong M, De La Monte SM. Sustained impairments in brain insulin/IGF signaling in adolescent rats subjected to binge alcohol exposures during development. *J Clin Exp Pathol.* 2012;2:106. doi:10.4172/2161-0681.1000106.
22. Maycotte P, Blancas S, Morán J. Role of inhibitor of apoptosis proteins and Smac/DIABLO in staurosporine-induced cerebellar granule neurons death. *Neurochem Res.* 2008;33(8):1534–40.
23. Oliveira SA, Fontanelli BAF, Stefanini MA, Chuffa LGA, Teixeira GR, Lizarte FSN, et al. Interaction of maternal separation on the UCh rat cerebellum. *Microsc Res Tech.* 2014;77:44–51.
24. Lewandowska E, Stepień T, Wierzbna-Bobrowicz T, Felczak P, Szpak GM, Pasennik E. Alcohol-induced changes in the developing cerebellum. Ultrastructural and quantitative analysis of neurons in the cerebellar cortex. *Folia Neuropathol.* 2012;50(4):397–406.
25. Dlugos CA, Pentney RJ. Effects of chronic ethanol consumption on SER of Purkinje neurons in old F344 rats. *Alcohol.* 2000;20:125–32.
26. Pentney RJ. Measurements of dendritic path lengths provide evidence that ethanol-induced lengthening of terminal dendritic segments may result from dendritic regression. *Alcohol Alcohol.* 1995;30:87–96.
27. Pentney RJ, Dlugos CA. Cerebellar Purkinje neurons with altered terminal dendritic segments are present in all lobules of the cerebellar vermis of ageing, ethanol-treated F344 rats. *Alcohol Alcohol.* 2000;35:35–43.
28. Pentney RJ, Quackenbush LJ. Dendritic hypertrophy in Purkinje neurons of old Fischer 344 rats after long-term ethanol treatment. *Alcohol Clin Exp Res.* 1990;14:878–86.
29. Pentney RJ, Quackenbush LJ. Effects of long durations of ethanol treatment during aging on dendritic plasticity in Fischer 344 rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1991;15:1024–30.
30. Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, Honda A, Imaizumi K, Tohyama M. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett.* 2003;357:127–30.
31. Shi Y. Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:677–84.
32. Taranukhin AG, Taranukhina EY, Saransaari P, Podkletnova IM, Pelto-Huikko M, Oja SS. Neuroprotection by taurine in ethanol-induced apoptosis in the developing cerebellum. *J Biomed Sci* 2010; 17. doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S12.
33. Lee JH, Tajuddin NF, Druse AJ. Effects of ethanol and ipsapirone on the expression of genes encoding anti-apoptotic proteins and an antioxidant enzyme in ethanol-treated neurons. *Brain Res.* 2009;1249:54–60.
34. Guo R, Zhong L, Ren J. Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 attenuates chronic alcohol exposure-induced apoptosis, change in Akt and Pim signalling in liver. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(5–6):463–8.
35. Antonio AM, Gillespie RA, Druse-Manteuffel MJ. Effects of lipoic acid on antiapoptotic genes in control and ethanol-treated fetal rhombencephalic neurons. *Brain Res.* 2011;1383:13–21.
36. Marks JL, Porte Jr D, Baskin DG. Localization of type I insulin-like growth factor receptor messenger RNA in the adult rat brain by *in situ* hybridization. *Mol Endocrinol.* 1991;5(8):1158–68.
37. Bondy CA. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci.* 1991;11:3442–55.
38. Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK, et al. Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31:1574–82.
39. Pignataro L, Varodayan FP, Tannenholz LE, Harrison NL. The regulation of neuronal gene expression by alcohol. *Pharmacol Ther.* 2009;124:324–35.
40. Cassini C, Linden R. Prenatal exposure to ethanol: toxicity, biomarkers and detection methods. *Rev Psiqu Clin.* 2011;38:116–21.
41. Dlugos CA, Pentney RJ. Morphometric evidence that the total number of synapses on Purkinje neurons of old F344 rats is reduced after long-term ethanol treatment and restored to control levels after recovery. *Alcohol Alcohol.* 1997;32:161–72.
42. Botta P, Souza FMS, Sangrey T, Schutter E, Valenzuela F. Alcohol excites cerebellar Golgi cells by inhibiting the Na⁺/K⁺ ATPase. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35:1984–96.
43. Botta P, Souza FMS, Sangrey T, Schutter E, Valenzuela F. Excitation of rat cerebellar Golgi cells by ethanol: further characterization of the mechanism alcohol. *Clin Exp Res.* 2012;36(4):616–24.

44. Botta P, Zucca A, Valenzuela F. Acute ethanol exposure inhibits silencing of cerebellar Golgi cell firing induced by granule cell axon input. *Front Integr Neurosci.* 2014;8:10. doi:[10.3389/fnint.2014.00010](https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00010).
45. Wang GH, Jiang ZL, Li YC, Li X, Shi H, Gao YQ, et al. Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2011;28(10):2123–34.
46. Oomen CA, Farkas E, Roman V, Van Der Beek EM, Luiten PGM. Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. *Front Aging Neurosci.* 2009;1:4. doi:[10.3389/neuro.24.004](https://doi.org/10.3389/neuro.24.004).
47. Shirpoor A, Minassian S, Salami S, Khadem-Ansari MH, Ghaderi-Pakdel F, Yeghiazaryan M. Vitamin E protects developing rat hippocampus and cerebellum against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis. *Food Chem.* 2009;113:115–20.