



Título: Análise do papel do receptor ADORA-A2 na via de transdução de sinal da cafeína em cultura de células neuronais no contexto da Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Alzheimer; Cafeína; Palmitato.

Aluno: Caio Felipe Romeiro;

Orientadora: Rosângela Maria Neves Bezerra;

Co-Orientador: Fernando Moreira Simabuco.

- **Introdução:**

O primeiro relato formal da doença de Alzheimer (DA) foi feito no ano de 1906, quando Alois Alzheimer exibiu o estudo de caso de uma paciente sua em um congresso na cidade de Tübingen¹. Já na primeira descrição constavam as principais alterações histológicas da doença: As placas e os novos neurofibrilares¹. As placas são formadas por agregados do peptídeo amiloide-beta ($A\beta$), que têm origem na proteína precursora amiloide (PPA), proteína transmembrana expressa em tipos celulares distintos e ainda sem função totalmente elucidada². Os novos neurofibrilares são formados por proteínas de citoesqueleto agregadas de forma anormal, sendo a TAU hiperfosforilada (pTAU) a mais comum nesses corpos³. Em condições fisiológicas, a TAU é uma proteína essencial para a estabilização de microtúbulos neuronais e para o transporte de nutrientes. Além destas marcas, muitas outras estão presentes e têm impacto na progressão da doença, como a inflamação e o prejuízo no metabolismo da glicose^{4,5}, por exemplo.

A inflamação no Sistema Nervoso Central (SNC), ou neuroinflamação, é uma resposta natural que ocorre em resposta a infecções, traumas físicos, metabólitos tóxicos e respostas autoimunes, o que é essencial para o modelamento cerebral durante o desenvolvimento, mas também para o controle de danos e processos regenerativos⁶. A questão é que a eficiência do processo é perdida nas doenças neurodegenerativas como a DA, fazendo com que o descontrole agrave os danos⁶. As alterações no metabolismo, especialmente a tolerância anormal à glicose ou resistência à insulina, são marcas comuns nas doenças neurodegenerativas, embora ainda não seja claro se elas são causa ou consequência, mas com certeza exercem papel fundamental na progressão⁷.

Como é bem sabido, sobrepeso e obesidade são condições de saúde que vêm crescendo muito ao redor do planeta, causando uma série de outras complicações de saúde⁸. Os pacientes obesos têm valores mais elevados de ácidos graxos (AGs) livres em sua corrente sanguínea⁹. O alto consumo de gorduras saturadas (ou AGs saturados), contribui para o aumento sérico desses lipídios, levando ao aumento de respostas inflamatórias que podem ser bem deletérias ao estado geral de saúde⁹, incluindo, por exemplo, as comentadas alterações de metabolismo energético características das doenças neurodegenerativas⁷. Isso tudo ocorre pela ativação de vias de sinalização distintas, que podem ou não ter interações entre si, além de ocorrer ou não nos diferentes tipos celulares⁹. Neste contexto, evidências de estudos experimentais apontam para o potencial papel neuroprotetor da cafeína, sendo exercido por meio de suas atividades antioxidantes, antiinflamatórias e anti apoptóticas, por exemplo, o que pode ajudar com a atenuação da progressão da doença⁹. Além disso, a evidência vinda dos estudos epidemiológicos também aponta para possíveis benefícios da cafeína no contexto da DA¹⁰⁻¹⁶, o que cria o interesse no estudo de aplicações da substância no contexto da doença.

- **Objetivos:**

- **Objetivo Geral:**

Investigar os efeitos protetores de concentrações fisiológicas de cafeína em células neuronais da linhagem Neuro-2a (N2a), tendo como estímulo tratamentos que simulem dietas hiperlipídicas, assim como vias de sinalização relacionadas à progressão da doença, a fim de observar os possíveis benefícios associados à cafeína.

- **Objetivos específicos:**

- Avaliar a proteção exercida de doses fisiológicas de cafeína em vias de sinalização inflamatórias e marcadores moleculares relacionados à DA;
- Avaliar a proteção exercida por doses fisiológicas de cafeína em vias de sinalização relacionadas à DA, mediante os tratamentos com palmitato.

- **Materiais e métodos:**

O projeto foi inteiramente realizado em cultura de células, com a linhagem N2a, de tecido neuronal de ratos. O protocolo utilizado para mensurar os efeitos dos tratamentos foi o *Western Blotting*. Os resultados das revelações foram analisados por meio do ImageJ (NCBI) e do GraphPad Prism, onde foram também realizadas as análises estatísticas (One-way ANOVA, com correção de Bonferroni, com nível de significância α de 0,05) e gerados os gráficos.

- **Resultados:**

- **Tratamento crônico de palmitato e cafeína I - 10 dias:**

Para o primeiro experimento, foram utilizadas as seguintes doses de cafeína e palmitato, respectivamente, 70 μ M e 25 μ M, a fim de observar os efeitos protetores da primeira em um contexto de dieta hiperlipídica de exposição crônica. A dose de cafeína de cafeína foi escolhida com base no valor capaz de causar a saturação em humanos, dentro do limite fisiológico¹⁷, e a de palmitato foi escolhida com base no trabalho de Nakandakari et al (2019), utilizando uma dose baixa, porém crônica. As células ficaram 8 dias sob o tratamento, tendo o meio renovado por 4 vezes no período, ou seja, com trocas feitas a cada 48h. No total, as células ficaram por 10 dias em cultura, o tratamento é iniciado dois dias após o plaqueamento, em razão do início da diferenciação celular.

Foram analisadas as seguintes proteínas (Imagem 1): AKT total e fosforilada (Proteína de funções muito amplas, funcionando como um “interruptor” de várias vias de sinalização diferentes e cuja hiper ou hipo ativação tem relação com diversos quadros patológicos, incluindo a resistência às insulina)¹⁹, S6K fosforilada (Proteína alvo da mTOR, responsável pela continuidade da sinalização que promove proliferação, crescimento e progressão do ciclo celular)²⁰, NLRP3 (Proteína componente do sistema imune inato que é uma das responsáveis pela ativação e secreção de citocinas pró-inflamatórias, respondendo a agentes externos e danos celulares)²¹ e GAPDH (Proteína integrante da via glicolítica, que foi utilizada como controle endógeno)²².

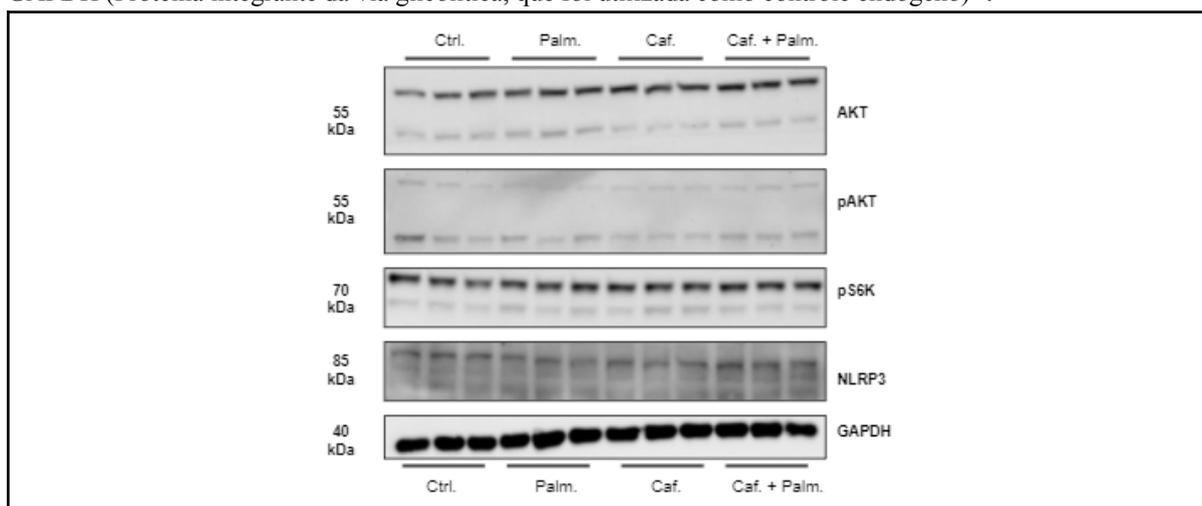


Imagem 1. Análise do conteúdo proteico por western blotting. Todas as proteínas reveladas, dispostas com nome, peso molecular e tratamento correspondente. O experimento foi realizado em uma placa de 6-well, com os seguintes tratamentos, feitos em triplicata: Controle (Ctrl.), palmitato 25 μ M (Palm.), cafeína 70 μ M (Caf.) e palmitato 25 μ M + cafeína 70 μ M (Caf. + Palm.).

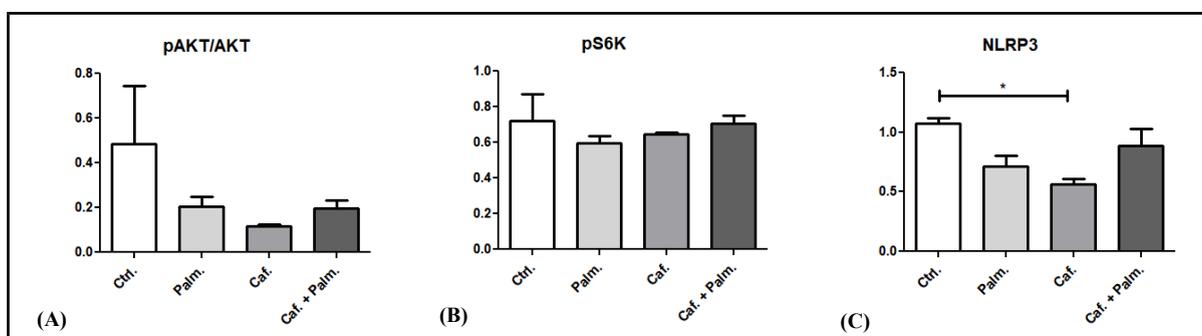


Imagem 2. Gráficos dos resultados das revelações. Todas as proteínas reveladas, dispostas com nome, tratamento correspondente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em ATM (A), AKT (B); eIF2a (C) e S6K1 (D). Somente a NLRP3 teve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o controle e a cafeína (E). O GAPDH foi utilizado como controle endógeno para normalizar as proteínas.

A AKT (Imagem 2A), apesar de não haver nenhuma diferença estatística, apresentou diminuição na fosforilação mediante os tratamentos com palmitato e cafeína. A cafeína, quando sozinha, foi capaz de diminuir ligeiramente a intensidade da fosforilação em relação ao tratamento de palmitato sozinho, o que não aconteceu no tratamento conjunto. A S6K fosforilada também ficou em níveis menores, em relação ao controle, nos tratamentos com palmitato e cafeína (Imagem 2B), sendo pouco menor no tratamento com palmitato, mas maior quando o tratamento foi combinado (palmitato e cafeína), os níveis da proteína fosforilada foram maiores, mas ainda menores que o controle. Porém, a análise dos resultados de S6K fica limitada por não ter havido a revelação da proteína total. A NLRP3 teve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas entre o controle e o tratamento de cafeína (Imagem 2C), o que indica um papel protetivo da substância. O tratamento de palmitato apresentou também menores níveis da proteína em relação ao controle, embora ainda ligeiramente maiores que o tratamento de cafeína. O tratamento conjunto, por sua vez, teve níveis muito próximos ao do controle, de modo que a união das duas substâncias parece contribuir para uma soma no efeito de aumentar os níveis da proteína, mas ainda com níveis pouco menores que o do controle.

○ **Tratamento crônico de palmitato e cafeína II - 8 dias:**

O desenho deste experimento foi igual ao anterior, a única alteração se deu no tempo total de cultivo das células, que foi um pouco menor. Foram analisadas as seguintes proteínas (Imagem 3): AKT total e fosforilada, ERK total e fosforilada (Proteína relacionada a processos de proliferação, diferenciação, adesão, migração e sobrevivência celular, com papéis relevantes em contextos fisiológicos e patológicos)²³, mTOR total e fosforilada (A via de sinalização da mTOR funciona como um regulador central do metabolismo celular, crescimento, proliferação e sobrevivência)²⁴ e S6K1 total e fosforilada. Além delas, também foi revelada a vinculina (proteína citoplasmática que é componente dos complexos de adesão associados à membrana, ancorando-os à matriz extracelular e às células adjacentes)²⁵, como controle endógeno.

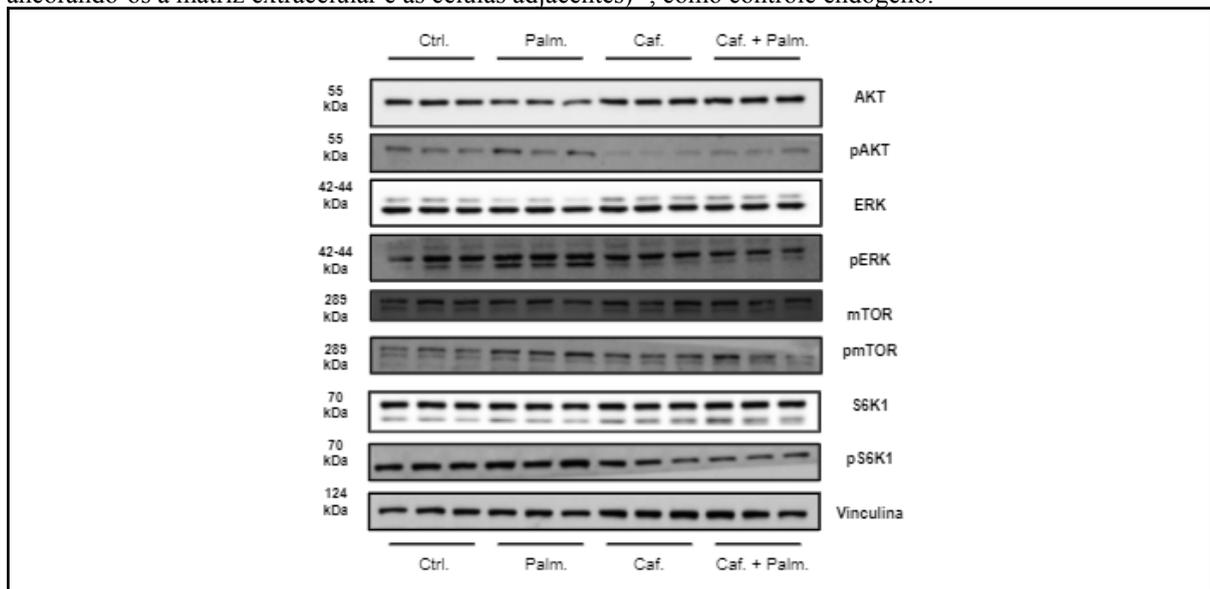
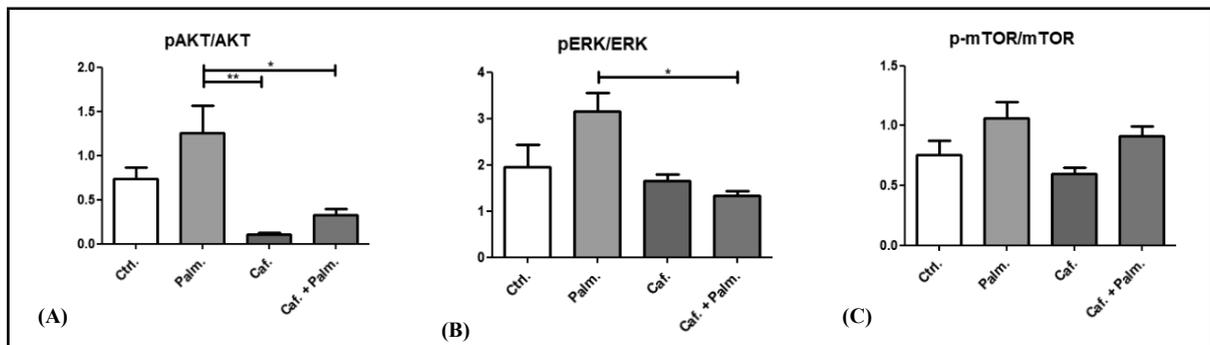


Imagem 3. Análise do conteúdo proteico por western blotting. Todas as proteínas reveladas, dispostas com nome, peso molecular e tratamento correspondente. O experimento foi realizado em uma placa de 6-well, com os seguintes tratamentos, feitos em triplicata: Controle (Ctrl.), palmitato 25 μ M (Palm.), cafeína 70 μ M (Caf.) e palmitato 25 μ M + cafeína 70 μ M (Caf. + Palm.).



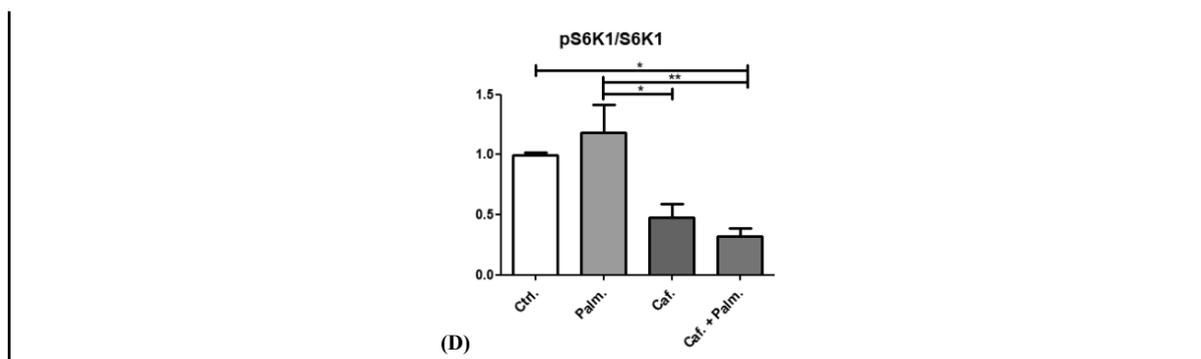


Imagem 4. Gráficos dos resultados das revelações. Todas as proteínas reveladas, dispostas com nome, tratamento correspondente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na mTOR (C). Em AKT (G), ERK (F) e S6K1 (H), foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). A vinculina foi utilizada como controle endógeno para normalizar as proteínas.

A fosforilação de AKT (Imagem 4A), ERK (Imagem 4B) e S6K1 (Imagem 4D) seguiram um padrão similar, com a presença de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nas três proteínas: Nas três, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento de palmitato e o tratamento conjunto de palmitato e cafeína, de modo que a cafeína foi capaz de barrar a fosforilação mais acentuada provocada pelo palmitato, mantendo os níveis mais baixos, próximos aos níveis atingidos no tratamento com a cafeína isolada. Nos três casos, a fosforilação no tratamento de palmitato era pouco maior que a fosforilação do controle. Coisa parecida aconteceu com a fosforilação de mTOR também (Imagem 4C), a diferença é que, além de não ter havido nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, a cafeína foi menos capaz de segurar a intensidade da fosforilação provocada pelo palmitato, de modo que o tratamento com as duas substâncias teve apenas uma diminuição ligeira na fosforilação em comparação ao palmitato isolado.

- **Discussão:**

No que diz respeito às alterações do metabolismo celular, muito comuns na DA, podemos lançar nosso foco sob algumas proteínas, com destaque para a AKT, mTOR e S6K⁷, que estão relacionadas dentro de uma mesma via de sinalização, assim como a ERK, que pode entrar como uma efetora da mTOR^{26,27}. Essas proteínas estão relacionadas à progressão da doença e também às principais marcas, como é o caso da agregação de A β e a hiperfosforilação da TAU, no contexto patológico^{27,28}. E, no contexto fisiológico, as quatro proteínas estão muito relacionadas a processos de sobrevivência celular, apoptose, diferenciação, proliferação, ou seja, a processos fundamentais mais ligados às funções básicas do metabolismo^{20,29-31}. No experimento I, não houveram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos padrões de fosforilação entre os tratamentos, mas fica clara a tendência de um padrão protetivo na fosforilação de AKT, tanto no tratamento com palmitato, quanto no tratamento com a cafeína, já que os níveis são menores do que os observados no controle (Imagem 2A). Além do mais, a cafeína sozinha teve sua intensidade de fosforilação ligeiramente menor que a observada no tratamento de palmitato, mas quando em conjunto, pareceu não exercer nenhuma diferença. No experimento II, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o tratamento de palmitato, e os tratamentos de cafeína e o conjunto (palmitato mais cafeína). Foi mantido o padrão de fosforilação de AKT (Imagem 4A) porém, dessa vez, o palmitato exerceu de fato um efeito mais acentuado, ultrapassando os níveis do controle. Outra diferença observada foi a proteção que a cafeína exerce no tratamento conjunto, mantendo os níveis de fosforilação muito mais baixos que os observados no tratamento com o palmitato isolado. Retomando a relação entre as diferentes proteínas supracitadas, fica claro que a fosforilação de AKT (Imagem 4A) teve padrão similar à fosforilação de ERK (Imagem 4B), mTOR (Imagem 4C) - com algumas pequenas particularidades - e S6K1 (Imagem 4D): A intensidade da fosforilação do palmitato é sempre maior do que a provocada pela cafeína e, a cafeína resulta em uma fosforilação menor que a do controle, exercendo um papel potencialmente protetivo. O que pode indicar que, de fato, o tratamento de palmitato tem o potencial de ser deletério às células N2a e contribuir para as principais manifestações da DA, enquanto a cafeína consegue exercer alguma proteção, sendo mais ou menos acentuada a depender da proteína em questão.

A proteína NLRP3, como dito anteriormente, é uma componente do sistema imune inato, responsável por partes da resposta imune, mediante a ameaças à célula²¹, levando em consideração a inflamação constante presente na DA e outras doenças neurodegenerativas, a proteína passa a ser um alvo de interesse e um possível contribuinte para a progressão da doença³². Levando em consideração os tratamentos realizados, todos tiveram

um papel potencialmente protetivo. A cafeína isolada foi a única capaz de produzir diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. O palmitato isolado apresentou uma quantidade de proteína ligeiramente maior e o tratamento conjunto quase igualou com o controle.

Conclusão:

Como uma síntese de todos os resultados mostrados acima, é possível observar que a cafeína possui um papel potencialmente protetivo em relação ao palmitato nas proteínas analisadas, uma vez que, comparado aos tratamentos com palmitato isolado, a cafeína sempre apresentou níveis menores (de fosforilação ou de proteína total), o que, de maneira crônica, pode ser relevante no quadro das doenças neurodegenerativas. E, além disso, nas situações onde o palmitato apresentou níveis mais acentuados que o controle, o que contribuiria para possíveis danos, a cafeína foi capaz de contrabalancear esses efeitos no tratamento conjunto, fazendo a proteção valer.

Bibliografia:

1. Hippus, H. & Neundörfer, G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 5, 101–108 (2003).
2. Abraham, C. R. 8 - Amyloid Beta Peptide and the Amyloid Cascade Hypothesis. in *The Handbook of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 262–272 (Wiley-Blackwell, 2011). doi:10.1002/9781444344110.
3. Machado, J. C. B. Doença de Alzheimer. in *Tratado de geriatria e gerontologia* (4a. ed.). (Grupo Gen - Guanabara Koogan, 2016).
4. Alzheimer's Association. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 16, 391–460 (2020).
5. McKee, A. C. & Gavett, B. E. 7 - The Neuropathology of the Dementing Disorders. in *The Handbook of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 235–253 (Wiley-Blackwell, 2011). doi:10.1002/9781444344110.
6. Cell Signaling Technology. Neuroinflammation. Cell Signaling <https://www.cellsignal.com/science-resources/hallmarks-of-neurodegeneration/hallmarks-neuroinflammation>.
7. Cell Signaling Technology. Altered Metabolism. Cell Signaling <https://www.cellsignal.com/science-resources/hallmarks-of-neurodegeneration/hallmarks-altered-metabolism>.
8. World Health Organization. Dementia. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics <http://id.who.int/icd/entiv/546689346> (2020).
9. Korbecki, J. & Bajdak-Rusinek, K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm. Res.* 68, 915–932 (2019).
10. Cao, C. et al. High Blood Caffeine Levels in MCI Linked to Lack of Progression to Dementia. *JAD* 30, 559–572 (2012).
11. Eskelinen, M. H., Ngandu, T., Tuomilehto, J., Soininen, H. & Kivipelto, M. Midlife Coffee and Tea Drinking and the Risk of Late-Life Dementia: A Population-Based CAIDE Study. *JAD* 16, 85–91 (2009).
12. Gelber, R. P., Petrovitch, H., Masaki, K. H., Ross, G. W. & White, L. R. Coffee Intake in Midlife and Risk of Dementia and its Neuropathologic Correlates. *JAD* 23, 607–615 (2011).
13. Lindsay, J. Risk Factors for Alzheimer's Disease: A Prospective Analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American Journal of Epidemiology* 156, 445–453 (2002).
14. Maia, L. & de Mendonca, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol* 9, 377–382 (2002).
15. Ritchie, K. et al. The neuroprotective effects of caffeine: A prospective population study (the Three City Study). *Neurology* 69, 536–545 (2007).
16. van Gelder, B. M. et al. Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study. *Eur J Clin Nutr* 61, 226–232 (2007).
17. Magkos, F. & Kavouras, S. A. Caffeine Use in Sports, Pharmacokinetics in Man, and Cellular Mechanisms of Action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 535–562 (2005).
18. Nakandakari, S. C. B. R. et al. Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 79, 284–293 (2019).
19. Thermo Fisher Scientific. Akt/PKB Cell Signaling Pathway. Thermo Fisher <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/signaling-pathways/akt/akt-overview.html>.
20. Cell Signaling Technology. Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (E2R1O) Mouse mAb #62016. Cell Signaling <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-s6-ribosomal-protein-ser235-236-e2r1o-mouse-mab/62016>.
21. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y. & He, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *IJMS* 20, 3328 (2019).
22. Merck. GAPDH. Sigma Aldrich https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g5262?lang=pt®ion=BR&gclid=Ci0KCOiA1pyCBhCtARIsAHaY_5dnq1H_IJfOtAppIxmKbnGLbFcK5oZuxBvgV6vNbTUEPFMEOk8QM4aAkBrEALw_wcB.
23. Buscà, R., Pouyssegur, J. & Lenormand, P. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front. Cell Dev. Biol.* 4, (2016).
24. Laplante, M. & Sabatini, D. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122, 3589–3594 (2009).
25. Peng, X., Nelson, E. S., Maiers, J. L. & DeMali, K. A. New Insights into Vinculin Function and Regulation. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 287 191–231 (Elsevier, 2011).
26. Damjanac, M. et al. Dissociation of Akt/PKB and ribosomal S6 kinase signaling markers in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 29, 354–367 (2008).
27. Cai, Z., Zhou, Y., Xiao, M., Yan, L.-J. & He, W. Activation of mTOR: a culprit of Alzheimer's disease? *NDT* 1015 (2015) doi:10.2147/NDT.S75717.
28. An, W.-L. et al. Up-Regulation of Phosphorylated/Activated p70 S6 Kinase and Its Relationship to Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology* 163, 591–607 (2003).
29. Cell Signaling Technology. Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb #4060. Cell Signaling <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-akt-ser473-d9e-xp-rabbit-mab/4060>.
30. Cell Signaling Technology. Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP® Rabbit mAb #5536. Cell Signaling <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-mtor-ser2448-d9c2-xp-rabbit-mab/5536>.
31. Cell Signaling Technology. Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/tyr204) (D.13.14.4E) XP® Rabbit mAb #4370. Cell Signaling <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-p44-42-mapk-erk1-2-thr202-tyr204-d13-14-4e-xp-rabbit-mab/4370?site-search-type=Products&N=4294956287&Ntt=erk&fromPage=plp>.
32. Prizada, R. H., Javadi, N. & Choi, S. The Roles of the NLRP3 Inflammasome in Neurodegenerative and Metabolic Diseases and in Relevant Advanced Therapeutic Interventions. *Genes* 11, 131 (2020).