**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

JAIRO PINHEIRO DA SILVA

Análise da proteína CASPASE 9 e dos microRNAs miR-21, miR-126 e miR-155 relacionados ao mecanismo de apoptose no cerebelo de ratos submetidos à isquemia cerebral focal associada ou não ao modelo de alcoolismo

**Ribeirão Preto
2019**

JAIRO PINHEIRO DA SILVA

Análise da proteína CASPASE 9 e dos microRNAs miR-21, miR-126 e miR-155 relacionados ao mecanismo de apoptose no cerebelo de ratos submetidos à isquemia cerebral focal associada ou não ao modelo de alcoolismo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, programa Clínica Cirúrgica – opção Morfologia e Medicina Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Jairo Pinheiro da

Análise da proteína CASPASE 9 e dos microRNAs miR-21, miR-126 e miR-155 relacionados ao mecanismo de apoptose no cerebelo de ratos submetidos à isquemia cerebral focal associada ou não ao modelo de alcoolismo

82 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli.

1. Isquemia focal; 2. Alcoolismo; 3 Cerebelo;
4. Apoptose; 5. microRNAs.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jairo Pinheiro da Silva

Análise da proteína CASPASE 9 e dos microRNAs miR-21, miR-126 e miR-155 relacionados ao mecanismo de apoptose no cerebelo de ratos submetidos à isquemia cerebral focal associada ou não ao modelo de alcoolismo

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica –
opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

.. Dou graças a Deus, a quem sirvo com a consciência limpa, como o serviram os meus antepassados, ao lembrar-me constantemente de você, noite e dia, em minhas orações.

2 Timóteo 1:3

DEDICATÓRIA

Dedico,

Aos meus Pais Joel Pinheiro da Silva e Zildinha Aparecida Faria da Silva por todo amor, apoio e ensino nesta jornada, denominada “Vida”, por suas incessantes orações. A vocês, o meu eterno respeito. Sem vocês, nada seria possível.

Dedico,

Aos meus Pais do coração, Washington Figueira e Conceição Aparecida Baggio Figueira. Pais que a cidade de Ribeirão Preto me deu. A vocês o meu muito obrigado por todo amor e suas incessantes orações. Sem vocês, nada seria possível.

Dedico,

A minha irmã Simone Pinheiro Viana, por ter me proporcionado uma infância inesquecível e por toda confiança. Me ensinaste o valor sólido da família.

Dedico,

Meus Sobrinhos Lucas Viana e Arthur Pinheiro Viana, por cada momento de alegria, descontração. Vocês são fundamentais na minha vida. Amo vocês.

Dedico,

À minha namorada Clara Isabel López Áragon. Esta pós graduação me deu a oportunidade de conhecê-la. Obrigado por trilhar metade deste caminho ao meu lado me dando forças e não me deixando desistir em nenhum momento, momentos de estudos e descontração. Obrigado por existir na minha vida!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli,

O senhor tornou me ensinou a tornar sonhos em realidades, a almejar o impossível e uma referência ímpar em minha carreira profissional. A quem me espelho nesta jornada e me ensinou o amor no Educar.

A Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli,

Palavras são poucas para expressar meu agradecimento à você. Você me ensinou o amor à pesquisa. São tantas coisas aprendi contigo. Minha eterna gratidão.

À Fermino Sanches Neto, obrigado por toda ajuda técnica.

Ao Técnico Rogério e Sandra por cada ensinamento e ajuda técnica.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Anatomia, Juliana Pischiottin da Silva Moraes e Larissa Beatriz Cossalter, por todo o auxílio com burocracia e prazos.

Aos meus amigos de laboratório Andressa Romualdo, Vagner Sarraipo, Breno Nery, Maria Fernanda Tiezzi, Múcio Assis, Rafael Zimak e Lucas Porsani por todos os momentos de discussões científicas, clínicas e pedagógicas, por cada momento de descontração também.

As minhas primas Débora Regina Faria Lamas, Ana Cláudia de Oliveira Porto, Dhândara Monise Faria Lamas e Dheliane Roberta Faria Lamas, por toda amizade e cumplicidade em toda minha vida, mesmo distantes, sempre presentes. Vocês fazem a diferença em mim.

Aos meus amigos Leonardo M. Buglio, Larissa Fávaro Marchi e a pequena Lívia Marchi Buglio, obrigado por esta pequenina representar tanto amor na minha vida. Família não precisa ter corrente sanguínea.

As minhas amigas Fernanda Lima da Silva e Livia Teixeira Neves, por cada momento de descontração, por cada apoio, cada choro e cada sorriso. Com vocês aprendi que a distância jamais separa um elo. “Um cordão de três dobras é mais difícil se romper.”

Ao grande amigo José Augusto Baranauskas, por todos os momentos de companheirismo, risadas e “terapias” nesta jornada.

À Carolina Giorgetto, pela amizade há anos e pelos grandes momentos de cumplicidade.

Ao meu amigo Prof. Dr. José Tarcísio da Silva por todos os conselhos científicos que me deu.

A todos da Clínica Reabilita, Rodrigo N Invernizzi, Taluama Martins, Jéssica N. Lourenço e Jhonatam Cardoso, vocês me ensinam a cada dia a importância do trabalho em equipe.

Ao Prof. Me. Wlather Spinelli Filho, por cada orientação e conselho nos grandes momentos de ansiedade desta jornada.

A todos que participaram deste momento direta e indiretamente, o meu muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

SILVA, J.P. **Análise da proteína CASPASE 9 e dos microRNAs miR-21, miR-126 e miR-155 relacionados ao mecanismo de apoptose no cerebelo de ratos submetidos à isquemia cerebral focal associada ou não ao modelo de alcoolismo.** 2019. 83f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: A isquemia cerebral é uma desordem da função cerebral ocasionado pela supressão sanguínea no tecido cerebral sem nenhuma outra causa aparente do que a vascular. Estudos revelam os danos causados pela isquemia cerebral focal repercutem não apenas na região da lesão isquêmica, mas também em outras regiões do encéfalo, dentre elas o cerebelo. O etanol atua diminuindo o tempo de reação do corpo e a resposta reflexa, produzindo até mesmo perda de coordenação motora. Por tempos, estudos tem verificado a ação do etanol no cerebelo. **Objetivos:** Este trabalho tem por objetivo analisar o córtex cerebelar de ratos submetidos a um modelo experimental de isquemia cerebral focal transitória por oclusão da ACM durante 90 minutos, seguida por reperfusão de 48 horas, associado ou não a modelo de alcoolismo. **Material e métodos:** Foram utilizados 50 ratos Wistar adultos, subdivididos em 5 grupos experimentais: grupo controle (C): animais submetidos apenas à anestesia; grupo sham (S): animais submetidos à simulação completa do procedimento cirúrgico; grupo isquêmico (I): animais submetidos à isquemia cerebral focal por 90 minutos seguido por reperfusão de 48 horas; grupo alcoolizado (A): animais que receberam diariamente álcool etílico absoluto diluído a 20% em água durante quatro semanas; e, grupo isquêmico e alcoolizado (IA): animais submetidos ao mesmo tratamento do grupo A e que, após quatro semanas foram submetidos à isquemia cerebral focal durante 90 minutos, seguido por reperfusão de 48 horas. As amostras do cerebelo coletadas e realizado a análise de imunohistoquímica da proteína CASPASE-9 e a análise sérica por meio de PCR – RT dos miRNAs miR-21, miR-126 e o miR155. **Resultados:** A expressão de CASPASE 9 teve maior expressão no grupos I, A e I+A. A análise dos miRNAs, o miR-126 foi maior nos grupos A e I+A, o miR-155 foi maior nos grupos I e I+A. **Conclusões:** Podemos concluir que a ocorrência de apoptose no córtex cerebelar, mesmo distante do foco isquêmico e que os miRNAs 126 e 155 apresentam correlação com a apoptose celular em ratos isquêmicos e submetidos ao modelo de alcoolismo crônico.

Palavras-chave: isquemia focal; alcoolismo; cerebelo; apoptose; microRNAs

ABSTRACT

SILVA, J.P. **ANALYSIS OF THE CASPASE 9 PROTEIN AND THE MICRORNAS MIR-21, MIR-126 AND MIR-155 RELATED TO THE MECHANISM OF APOPTOSIS IN THE CEREBELLUM OF RATS SUBMITTED TO FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA ASSOCIATED OR NOT TO THE MODEL OF ALCOHOLISM". UNIVERSIDADE SÃO PAULO. 2019. 83f. Medicina School of Ribeirão Preto of São Paulo University, Ribeirão Preto, 2019.**

INTRODUCTION: Cerebral ischemia is a disorder of brain function caused by blood suppression in brain tissue with no apparent cause other than vascular. Studies reveal the damage caused by focal cerebral ischemia to affect not only the region of the ischemic lesion but also other regions of the brain, including the cerebellum. Ethanol acts by decreasing the reaction time of the body and the reflex response, producing even loss of motor coordination. For some time, studies have verified the action of ethanol in the cerebellum. **AIMS:** This study aims to analyze the cerebellar cortex of rats submitted to an experimental model of transient focal cerebral ischemia by ACM occlusion for 90 minutes, followed by reperfusion of 48 hours, associated or not with the model of alcoholism. **METHODS:** Fifty adult Wistar rats were used, subdivided into 5 experimental groups: control group (C): animals submitted to anesthesia only; sham group (S): animals submitted to complete simulation of the surgical procedure; ischemic group (I): animals submitted to focal cerebral ischemia for 90 minutes followed by reperfusion of 48 hours; alcoholic group (A): animals that received daily absolute ethanol diluted 20% in water for four weeks; and ischemic and alcoholized group (AI): animals submitted to the same treatment as group A and after four weeks were submitted to focal cerebral ischemia for 90 minutes, followed by reperfusion of 48 hours. The cerebellum samples were collected and the immunohistochemical analysis of the CASPASE-9 protein and the serum analysis by means of RT-PCR of miRNAs miR-21, miR-126 and miR155 were performed. **RESULTS:** The expression of CASPASE 9 had higher expression in groups I, A and I + A. The miRNAs analysis, miR-126 was higher in groups A and I + A, miR-155 was higher in groups I and I + A. **CONCLUSIONS:** We can conclude that apoptosis occurs in the cerebellar cortex, even if it is distant from the ischemic focus, and that miRNAs 126 and 155 present a correlation with cellular apoptosis in ischemic rats and submitted to the chronic alcohol model.

KEYWORDS: focal ischemia; alcoholism; cerebellum; apoptosis; microRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cerebelo (Visão dorsal).....	21
Figura 2. Cerebelo (Visão ventral).....	23
Figura 3. Diferenciação celular no processo de (a) Necrose e (b) Apoptose.....	34
Figura 4. Ilustração das vias da apoptose: extrínseca (por receptores de morte) e intrínseca (mitocondrial).....	36
Figura 5. Biogênese dos microRNAs.....	38
Figura 6. Formação e distribuição dos grupos experimentais.....	43
Figura 7. Animal em decúbito dorsal fixo na prancha de madeira após intubação e conectado ao respirador (R) para pequenos animais.....	45
Figura 8. Desenho (A) e foto (B) ilustrando a exposição dos músculos cervicais superficiais. A. No antímero direito: glândula parótida (GP); glândula sublingual (GL); glândula submandibular (GS). No antímero esquerdo: músculo digástrico (D); músculo esterno-hióideo (EH); músculo esterno-mastóideo (EM); músculo masséter (M); músculo omo-hióideo (OH); músculo trapézio-clavicular (TC).....	46
Figura 9. (A) Desenho e (B) fotografia representando a exposição das artérias: carótida comum esquerda (CCE), carótida interna esquerda (CIE) e carótida externa esquerda (CEE), com dois dos seus ramos cervicais (*), após afastamento da musculatura cervical superficial.....	47
Figura 10. Fotografia mostra a introdução do fio obstrutor (seta) no interior da ACEE em direção à ACCE e ACIE, após retirada do microclipe da ACIE (*) para passagem do fio. Clampagem da ACCE e APPE.....	48
Figura 11. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME (M) (no detalhe superior direito) e a ligadura da ACE-E na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). Por fim, a reperfusão da ACC-E (C) é permitida após a retirada do seu microclipe. Artéria carótida interna esquerda (I); artéria cerebral anterior esquerda (A); artéria pterigopalatina esquerda (P).....	49
Figura 12. Corte interorbital para retirada do encéfalo.....	50

Figura 13. Encéfalo isolado demonstrando a região de secção coronal do cerebelo (pontilhado).....	51
Figura 14. Fotomicrografia da visão geral de duas folhas cerebelares do hemisfério cerebelar esquerdo com marcação nuclear positiva para CASPASE 9, demonstrando as regiões da camada molecular (CM), camada granular (CG) e células de Purkinje (CP) (seta). 100x.....	56
Figura 15. Fotomicrografias de visão da camada molecular do hemisfério cerebelar esquerdo com marcação nuclear positiva para CASPASE 9 – 400x (A – Grupo Controle, B- Grupo Sham, C- Grupo Isquêmico, D- Grupo Alcoolizado e E- Grupo Isquêmico + Alcoolizado), com setas demonstrando marcação positiva nuclear na fotomicrografia E.....	57
Figura 16. Fotomicrografias de visão da camada granular do hemisfério cerebelar esquerdo com marcação nuclear positiva para CASPASE 9 – 400x (A – Grupo Controle, B- Grupo Sham, C- Grupo Isquêmico, D- Grupo Alcoolizado e E- Grupo Isquêmico + Alcoolizado), com setas demonstrando marcação positiva nos diferentes grupos.....	59
Figura 17. 1 Fotomicrografias de visão das células de Purkinje do hemisfério cerebelar esquerdo com marcação nuclear positiva para CASPASE 9 – 400x (A – Grupo Controle, B- Grupo Sham, C- Grupo Isquêmico, D- Grupo Alcoolizado e E- Grupo Isquêmico + Alcoolizado), com setas demonstrando marcação positiva nos diferentes grupos.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão protéica de CASPASE-9 no tecido molecular dos animais dos grupos estudados. Foi observada diferença estatística na comparação entre os grupos CxI ($p=0.002$), CxI+A ($p=0.008$) e SxI ($p=0.019$), pós teste de Dunns..... 57
- Gráfico 2.** Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão protéica de CASPASE-9 no tecido granular nos animais dos grupos estudados. Foi observada diferença estatística na comparação entre os grupos CxI ($p=0.0198$), entre os grupos CxI+A ($p=0.0006$) e entre os grupos SxI+A ($p=0.0080$), pós teste de Dunns.....58
- Gráfico 3.** Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão protéica de CASPASE-9 nas células de Purkinje nos animais dos grupos estudados. Foi observada diferença estatística na comparação entre os grupos CxI ($p=0.034$), entre os grupos CxI+A ($p=0.0059$) e entre os grupos SxI+A ($p=0.017$) no teste Kruskal-Wallis, pós teste de Dunns.....60
- Gráfico 4.** Representação da média e desvio padrão da expressão sérica do miRNA-21 entre os grupos estudados, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,3325$, teste Kruskal-Wallis).62
- Gráfico 5.** Representação da média e desvio padrão da expressão sérica do miRNA-126 entre os grupos estudados, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos SxI e SxA ($p<0,05$, teste Kruskal-Wallis).....63
- Gráfico 6.** Representação da média e desvio padrão da expressão sérica do miRNA-155 entre os grupos estudados, com diferença estatisticamente significante entre os grupos CxA, SxA e SxI+A ($p<0,05$, teste Kruskal-Wallis).....64

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Cerebelo.....	20
2.1.1 Anatomia macroscópica do cerebelo.....	20
2.1.1.2 Fissuras e Lobos.....	22
2.1.1.3 Vias cerebelares.....	23
2.2 Isquemia Cerebral.....	24
2.2.1 Apontamentos Históricos.....	24
2.2.2. A Isquemia Cerebral.....	25
2.2.2 Mecanismos envolvidos na isquemia cerebral.....	28
2.2.3 Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral.....	30
2.2.3.1 Modelos experimentais de isquemia cerebral focal.....	30
2.3. Alcoolismo	30
2.3.1 Cerebelo e etanol	31
2.4 Apoptose Celular.....	33
2.5 Os MicroRNAs.....	36
2.5.1 Biogênese dos MicroRNAs	37
2.5.2. Os miRNAs e a Apoptose Celular.....	38
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. OBJETIVOS.....	41
4.1. Objetivo geral.....	41
4.2. Objetivos específicos.....	41
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1. Animais.....	42
5.2 Grupos experimentais.....	42
5.3 Modelo de Indução ao Alcoolismo.....	43
5.4 Modelo de Indução a Isquemia Focal cerebral.....	44
5.4.1 Preparação do fio obstrutor e procedimentos gerais.....	44
5.4.2. Procedimento Cirúrgico.....	44
5.4.2.1. Procedimentos Gerais.....	44

5.4.2.2. Procedimentos para indução da isquemia.....	46
5.4.3 Retirada do encéfalo e coleta do cerebelo.....	50
5.5 Procedimentos para análise do cerebelo.....	51
5.5.1 Análise imunohistoquímica da proteína CASPASE 9.....	51
5.5.2 Análise por PCR em tempo real dos microRNAs.....	53
5.5.2.1 Análise da expressão gênica sérica dos microRNAs.....	53
5.5.2.2 Extração de RNA	53
5.5.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) dos miRNAs.....	53
5.5.2.4 PCR em tempo real.....	54
5.6 Análise Estatística.....	55
6. RESULTADOS.	56
6.1. Análise imunohistoquímica de CASPASE 9.....	56
6.1.1 Análise da Porcentagem de Células Positivas do Tecido Molecular.....	56
6.1.2 Análise da Porcentagem de Células Positivas do Tecido Granular.....	57
6.1.3 Análise da Porcentagem de Células Positivas nas Células de Purkinje....	59
6.2 Análise da expressão sérica dos miRNAs.....	62
6.2.1 Análise da expressão sérica do miRNA-21.....	62
6.2.2 Análise da expressão sérica do miRNA-126.....	63
6.2.3 Análise da expressão sérica do miRNA-155.....	64
7. DISCUSSÃO.....	65
8. CONCLUSÕES.....	73
9. REFERÊNCIAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

O cerebelo é uma das divisões do encéfalo que ocupa grande parte da fossa crânica posterior, sendo recoberto pela tenda do cerebelo, uma das pregas da dura-máter craniana. Acredita-se que Haerophilus (338-280 a.C.) fez o reconhecimento do cerebelo humano como uma divisão diferenciada do encéfalo. Vários pesquisadores, tais como Galeno, Willis e Vesalius, contribuíram com novos conhecimentos a respeito da anatomia e neurofisiologia do cerebelo. Os estudos prosseguiram gerando avanços em aspectos morfológicos, histológicos e comparados. Após o conhecimento inicial de que suas funções estão relacionadas ao controle motor, Flourens (1823) assegurou que suas funções também auxiliam na coordenação de movimentos e no equilíbrio corporal (DAMIANI et al., 2016).

Análises neuropatológicas posteriores revelaram que existem alterações do cerebelo em doenças cognitivas e comportamentais (ENGELHARDT; MOREIRA, 2009). Várias patologias degenerativas diminuem as funções motoras do cerebelo, tais como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, as distrofias musculares e a isquemia cerebral (CAMPOS-MOJENA et al., 2016).

A isquemia cerebral é a segunda maior causa de morte no mundo, sendo responsável por 6,7 milhões de óbitos em 2012. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, até 2030, o AVE (Acidente Vascular Encefálico) continuará sendo a segunda maior causa de morte no mundo, tornando-se responsável por 12,2% dos óbitos por ano no planeta (SARDÁ et al., 2018).

A isquemia cerebral é um fenômeno observado com alguma frequência na prática clínica e em procedimentos cirúrgicos, resultando em déficits neurológicos incapacitantes, ou até mesmo, no óbito do paciente, sendo considerado um grave problema para a área da saúde e de difícil prognóstico (CAMPOS-MOJENA et al., 2016).

A ausência do fluxo sanguíneo cerebral, seja por uma obstrução por um trombo/embolo (isquêmico) ou lesão vascular (hemorrágico), conduz à privação de oxigênio e glicose à área do encéfalo acometida (ANTONIO; DIAS; COLLI, 2000). Uma vez esta interrupção persiste, ocasiona vários eventos bioquímicos que levam à morte neuronal, e imediatamente a outros eventos biológicos que são ocasionados através de um processo de repercussão (OLIVEIRA, 2002).

A apoptose celular é um dos eventos que ocorre normalmente no SNC (Sistema Nervoso Central) durante seu desenvolvimento, mas também logo após à isquemia cerebral ou por influência de fatores exógenos, variando conforme a magnitude do estímulo. Detecções imunohistoquímicas evidenciam uma grande diversidade de eventos no processo apoptótico durante a isquemia, auxiliando na detecção da patologia. Inicialmente, há diminuição de ATP (Adenosina Tri Fosfato) e acidose láctica, com aumento do cálcio intracelular, com consequente perda da homeostase dos canais iônicos. Isso leva à formação de radicais livres, com produção de peroxinitrito e liberação de citocina, ocasionando assim uma resposta inflamatória e a consequente ativação de leucócitos. Há também uma despolarização da membrana devido a liberação excessiva de aminoácidos excitatórios como glutamato e dopamina, que induzem este evento (ALBUQUERQUE et al., 2016; CHO et al., 2018).

Devido à diversidade anatômica humana, a localização precisa do local do evento isquêmico é de extrema importância para definir a conduta terapêutica. A isquemia cerebral pode ser causada por oclusão de artérias de pequeno ou grande calibre. As oclusões de vasos de grande calibre, como a artéria carótida interna, a artéria cerebral média e a artéria basilar, geralmente causam AVEs de maior gravidade, com maior risco de sequelas neurológicas e consequentemente, um pior prognóstico. Esse evento pode afetar estruturas distantes do seu foco de lesão, entre elas o cerebelo. Estudos experimentais evidenciam eventos apoptóticos no cerebelo após isquemia cerebral focal (BRATINA ET AL., 1995; CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001).

Outros agentes nocivos, entre eles o alcoolismo, afetam o SNC, podendo causar isquemia cerebral. O alcoolismo afeta milhões de pessoas no mundo. Cerca de 10% das pessoas de populações de centros urbanos, consomem álcool diariamente, independente da idade, sexo, nível de instrução e poder aquisitivo. É comprovado que o consumo excessivo de etanol está associado com vários riscos à saúde, sendo responsável por uma alta taxa de morbidade e mortalidade (SARDÁ et al., 2018). O alcoolismo conceitua-se como uma síndrome multifatorial, que acomete o estado físico, mental e social das pessoas, alterando as estruturas e funções do encéfalo e, em alguns casos, podendo conduzir à neurodegeneração do SNC (FILIPE; POMBO, 2012; HAES et al., 2010) .

O álcool atuando como um depressor do SNC, apresenta-se inicialmente romovendo sensação de euforia, seguida de sonolência e mal-estar, com efeitos

ansiolíticos e sedativos, retardando o tempo de reflexos e reações e desencadeando perda de coordenação motora. A sintomatologia do seu consumo pode ser identificada com náuseas, vômitos, cefaléia, polidipsia e fadiga. Em doses elevadas, induz à perda de consciência, hipoglicemia e até o coma. Além disso, o etanol foi avaliado no cerebelo por décadas, em decorrência das alterações de coordenação motora acarretadas por seu consumo (BAZOVKINA et al., 2017; HAES et al., 2010).

O uso crônico de álcool aumenta o dano cerebral isquêmico, devido à deficiência da vasorreatividade cerebral. (FADDA, 1998)

Portanto, este trabalho tem por objetivo analisar e comparar entre os grupos estudados, a expressão da proteína caspase 9 e dos miRs-21, -126 e -155 relacionados ao mecanismo da apoptose no cerebelo de ratos machos adultos, partindo de um modelo experimental de isquemia cerebral focal transitória por oclusão da artéria cerebral média (ACM), associado ou não ao modelo de alcoolismo crônico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerebelo

2.1.1 Anatomia macroscópica do cerebelo

O sistema nervoso tem origem do folheto embrionário ectodérmico e sua maior parte deriva do tubo neural e das cristas neurais. O cerebelo também é conhecido como o "Cérebro Pequeno". Constitui 11% da massa encefálica e é formado através da parte dorsal do metencéfalo, situando-se posteriormente à ponte e o bulbo, auxiliando na formação do teto do IV ventrículo. O cerebelo repousa inferiormente sob a fossa cerebelar do osso occipital, facilitando a comunicação da medula espinal ao bulbo através do pedúnculo cerebelar inferior, e com a ponte e o mesencéfalo através dos pedúnculos cerebelares médios e superiores, respectivamente. Anatomicamente, o cerebelo é constituído por uma porção ímpar e mediana, o vérmis, que conecta os hemisférios cerebelares direito e esquerdo (Figura 1). Os lobos occipitais dos hemisférios cerebrais estão superiormente ao cerebelo, sendo separados por uma prega bastante resistente da dura-máter craniana, o tentório cerebelar ou tenda do cerebelo. Parte da cavidade do quarto ventrículo se estende como uma fenda transversal, que é limitada cranialmente por uma lâmina de substância branca denominada véu medular superior (DAMIANI et al., 2016).

Na sua face superior, apresenta sulcos, com fibras dispostas predominantemente transversais, que delimitam lâminas finas, denominadas folhas do cerebelo. Também são observados sulcos mais profundos denominadas fissuras do cerebelo, que delimitam os lóbulos, contendo várias folhas (CAMPOS; GUASTI, 2011).

Figura 1. Cerebelo (Visão dorsal). Fonte: Netter (2000)

O cerebelo apresenta uma camada de substância cinzenta superficialmente e uma camada de substância branca, mais profundamente. Também podem ser descritos quatro pares de pequenos núcleos de substância cinzenta na região central do cerebelo (DANGELO, FATTINI, 2001).

A superfície do cerebelo é marcada por uma série de fissuras que correm quase paralelas entre si. Essas fissuras subdividem o cerebelo em faixas estreitas semelhantes a folhas, que se apresentam em um eixo transversal. A região superficial de cada folha cerebelar é composta de substância cinzenta, enquanto em seu interior é observada substância branca. A partir da secção parassagital na região da folha cerebelar, pode ser observada a aparência característica de três camadas chamadas em conjunto, *Arbor Vitae* (*Tree of Life*) (DAMIANI et al., 2016).

Essas camadas são:

- **Camada molecular ou mais externa:** nesta camada estão as células estreladas e células em cesto, também estão as arborizações dendríticas das células de Purkinje e as fibras paralelas. As células estreladas estabelecem sinapses com os dendritos das células de Purkinje e recebem estímulos das fibras paralelas. Por outro lado, as células em cesto estendem axônios acima dos corpos celulares de Purkinje

que emitem ramificações sobre estes e também recebem estímulos das fibras paralelas. Nesta camada também se encontram os dendritos das células de Golgi, cujas junções localizam-se na camada granular.

- **Camada de células de Purkinje ou intermédia:** está formado pelas junções das células de Purkinje, cujos dendritos estão na camada molecular e os seus axónios são dirigidos para a camada granular sobre os núcleos profundos do cerebelo. Estas células são a principal eferência para o córtex cerebral.

- **Camada granular ou interna:** está composta principalmente de células granulares e alguns interneurónios Golgi. As células granulares estendem os seus axónios na camada molecular, onde se bifurcam para formar as fibras paralelas. Além disso, esta camada é uma formação de vias de comunicação a partir do cérebro, utilizando 2 tipos de fibras: musgosa e trepadora.

2.1.1.2 Fissuras e Lobos:

Algumas das fissuras na superfície do cerebelo são mais profundas que outras, dividindo o cerebelo em lobos. A fissura pósterolateral, a primeira fissura que surge durante o desenvolvimento do órgão, está presente na região ventral e separa o corpo do cerebelo do lobo floclonodular. Por sua vez, o corpo do cerebelo é dividido em lobos anterior e posterior pela fissura primária (fissura prima), observada de forma transversal na sua face dorsal (Figuras 1 e 2). No interior do corpo do cerebelo, outras fissuras menos profundas e sem importância ontogenética e filogenética, dividem cada lóbulo em lóbulos) (ENGELHARDT; MOREIRA, 2009; CAMPOS; GUASTI, 2011).

Figura 2. Cerebelo (Visão ventral). Fonte: Netter (2000)

2.1.1.3 Vias cerebelares

O cerebelo recebe informações de diferentes áreas do sistema nervoso: do córtex cerebral, do tronco encefálico e da medula espinhal, além disso, possui conexões eferentes principalmente pelos pedúnculos cerebelares médios e inferiores. Quase todas as vias aferentes cerebelares terminam na camada granular em forma de fibras musgosas. Este tipo de fibra representa a informação de entrada principal ao cerebelo e se origina nos núcleos do tronco cerebral, estabelecendo sinapses com as fibras dendríticas das células de Purkinje. No entanto, o núcleo olivar inferior estende as suas projeções realizando sinapses com as fibras dendríticas das células granulares (WU et al., 2018).

A via principal de informação do cerebelo se estende pelos núcleos centrais do cerebelo e, estas projeções emitem vias para o pedúnculo cerebelar superior que irá projetar tanto às áreas do córtex cerebral quanto aos centros motores do tronco encefálico, auxiliando nas funções do córtex cerebral (OLIVEIRA, 2002).

O papel inicial do cerebelo destaca-se pelo seu envolvimento motor e recentes pesquisas relatam a sua contribuição para funções não-motoras, incluindo a cognição, emoção ou comportamento, uma vez que esta apresenta extensas ligações com regiões corticais e subcorticais que não são dirigidas apenas para áreas motoras. Na área motora, o cerebelo atua como centro de coordenação e organização dos movimentos. Através das suas conexões, recebe informações motoras desenvolvidas

a nível cortical, auxiliando na execução de planos motores e é responsável por comparar e corrigir o desenvolvimento e evolução de atos motores, entre eles a manutenção do tônus muscular na mudança de posicionamento corpóreo (MANUEL; PAULA, 2001).

Estudos clínicos examinam as patologias isquêmicas no córtex cerebral que também acometem o cerebelo, apresentando distúrbios que produzem síndromes motoras, tais como a ataxia cerebelar, caracterizados pela falta de coordenação e equilíbrio, alterações da marcha, movimentos anormais das extremidades e dos olhos e disartria, entre outros sintomas; fornecendo uma ampla evidência de que o cerebelo está envolvido em uma forma específica da aprendizagem motora associativa, especialmente nas sequências motoras (CAMPOS; GUASTI, 2011; ENGELHARDT; MOREIRA, 2009; OLIVEIRA, 2002) .

2.2 Isquemia Cerebral

2.2.1 Apontamentos Históricos

Há milênios as doenças cerebrovasculares atingem toda a humanidade. Foi descrito pela primeira vez apenas como um possível evento e documento por Edwin Smith em um papiro, que consta relatos do fundador da medicina egípcia, aproximadamente 3.000 a.C. (SELIM, 2007).

No período de Hipócrates, antes de Cristo, na Grécia antiga, foi introduzido o termo apoplexia, ao que se referia como “queda súbita e com violência”, sendo utilizado nos pacientes que apresentavam privação cerebral sanguínea, diminuindo o humor da vitalidade. O também grego, mas cidadão da cidade de Roma, Cláudio Galeno, no início da era cristã, assumiu o termo como verdade, e até desenvolveu e descreveu os conceitos hipocráticos, citando que a apoplexia é causada pela privação do fluxo do “espírito vital” ao cérebro, o sangue (SELIM, 2007).

Tais descrições, tidas como dogmas, perduraram por toda a Idade das Trevas, aproximadamente mais de quinze séculos. Nessa época sombria, a teoria da apoplexia se embasava na teoria mista de conceitos clássicos humorais com algumas tentativas esparsas de explicação obstrutiva para a ocorrência deste fenômeno. Já no século XVII, no Renascentismo, a tentativa para a compreensão dos conceitos hipocrático-galênicos, teve a colaboração de William Harvey na descrição do sistema

de circulação sanguínea, com uma discreta incursão no terreno da obstrução da circulação cerebral (CUNNINGHAM, 1994), sendo descrita pormenorizadamente por Thomas Willis, no mesmo século, introduzindo o termo “stroke” para definir as doenças cerebrovasculares, traduzindo o termo literal da palavra grega apoplexia (SELIM, 2007).

Logo após, na mesma época, com a teoria da apoplexia, Johann Jakob Wepfer, confirmou que os pacientes que supostamente faleciam de “apoplexia pletórica”, na realidade tinham colações sanguíneas em seu cérebro e, os que não apresentavam ditas colações, eram portadores de isquemia cerebral propriamente dita, denominada “apoplexia flegmática”, apresentando uma maior taxa de sobrevida. Além disso, foi constatado pela primeira vez, que quando o fluxo das artérias carótidas ou das artérias vertebrais eram interrompidos, causavam apoplexia (CUNNINGHAM, 1994).

Já no século XIX, Jean Cruveilhier, comprovou a isquemia cerebral através de aspectos anatômicos; Rudolf Virchow descreveu o mecanismo tromboembólico; Amédée Dechambre descreveu a isquemia cerebral utilizando exames de imagem do encéfalo “pós óbito”; Charles Foix e Paul Broca, utilizaram o exame clínico de pacientes que haviam sofrido isquemia cerebral, fazendo a descrição inicial dos conceitos semiológicos da localização cerebral na isquemia (SELIM, 2007).

A grande compreensão sobre a isquemia cerebral ocorreu apenas no século XX, com o auxílio de mecanismos de diagnóstico na forma de exames complementares. Um grande evento neste período foi a descrição minuciosa realizada por Miller Fisher, na década de 60, com grandes observações clínicas e patológicas, por meio de diferentes vias de isquemia cerebral, como infartos lacunares, doença arterial carotídea e até mesmo a isquemia cerebral (ESTOL, 1996).

2.2.2. A Isquemia Cerebral

A isquemia cerebral é uma desordem da função cerebral ocasionado pela supressão sanguínea no tecido cerebral sem nenhuma outra causa aparente do que a vascular. Devido à bioenergética do cérebro, o SNC precisa de um fluxo contínuo de sangue com oxigênio e glicose em seu metabolismo, com uma alta taxa energética e uma vasta dependência do metabolismo aeróbio da glicose (WU et al., 2018). Ocorrendo um desarranjo na taxa de fluxo sanguíneo ou no suprimento arterial de oxigênio, pode se afetar gravemente a função do cérebro, promovendo lesões e

perdas das funções neurológicas, devido às grandes alterações bioquímicas e moleculares ocorridas (QIN et al., 2018; THORNTON et al., 2017). As possíveis causas da interrupção sanguínea, seja ela transitória ou permanente, são principalmente: trombozes, embolia, hemorragia, infarto e choque hemorrágico (CAMPOS-MOJENA et al., 2016; CANAZZA et al., 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, entre as doenças cardiovasculares, a isquemia cerebral é a principal causa de morte no Brasil e no mundo dentro das doenças vasculares, ocasionando cerca de 70.232 óbitos registrados em 2008. Após estes dados alarmantes, no ano de 2012, foi lançado e regularizado através da Portaria nº 664 o “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Trombólise no Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Agudo –” com o objetivo de auxiliar e orientar nas condutas de profissionais da área da saúde sobre seu diagnóstico e conduta terapêutica clínica, cirurgia e na reabilitação. Essa patologia tornou-se um grande problema de saúde pública com alarmantes investimentos socioeconômicos, aproximadamente 6% de todo o orçamento da saúde, na tentativa de aumentar a expectativa de vida (WANG et al., 2014).

Nos países em desenvolvimento, com o aumento do envelhecimento da população, estas taxas sofrerão um grande aumento nos próximos 20 anos. Contudo, novos métodos terapêuticos necessitam ser desenvolvidos, para diminuir o índice da doença, a eficácia do tratamento, a melhora da qualidade de vida do paciente e; consequentemente, reduzindo os custos e efeitos adversos (DONNAN et al., 2008; GO et al., 2014).

A maior prevalência de isquemia cerebral é em 87% pela obstrução e interrupção do fluxo sanguíneo devido à formação de trombos ou processos embólicos. Na isquemia cerebral hemorrágica, um 10% são ocasionadas por hemorragias cerebrais devido à ruptura de um vaso sanguíneo, causando um extravasamento de sangue no tecido cerebral (DONNAN et al., 2008; WU et al., 2018).

Na isquemia cerebral hemorrágica, a artéria mais comumente acometida é a artéria cerebral média (ACM) ou suas ramificações profundas. A intensidade e a duração do tempo de isquemia são parâmetros fundamentais para avaliar a gravidade do dano tecidual cerebral acometido após a lesão. A região central ou núcleo isquêmico corresponde ao local onde ocorre uma diminuição abrupta do fluxo sanguíneo (somente mantém 10 a 15 % do fluxo sanguíneo normal) (CAMPOS-MOJENA et al., 2016). Essa região sofre de uma carência bioenergética e um

desequilíbrio iônico intenso, levando a região acometida a danos irreversíveis, ou seja, um alto índice de necrose celular. A área de penumbra é a região entre o tecido sadio e a região do núcleo isquêmico, tornando-se uma região de grande importância devido ao aporte sanguíneo colateral; porém reduzido. Essa área promove a vitalidade das células cerebrais, sendo uma área dinâmica a fim de amenizar os efeitos ocasionados pela isquemia, podendo ou não haver intervenção endógena ou exógena. A perfusão nesta área tem uma velocidade de 15-18 mL/100g/minuto, levando à morte celular devido a um alto índice apoptótico. Por outro lado, esta área é passível de salvamento, quando são utilizados mecanismos neuroprotetores para vascularizar o local lesado (WU et al., 2018; ZHANG et al., 2005).

Em termos celulares, o dano isquêmico no tecido cerebral não é uniforme, sendo as células endoteliais mais resistentes que as gliais, e estas por sua vez, mais resistentes que os neurônios. Mesmo entre os neurônios, alguns apresentam maior susceptibilidade à isquemia do que outros, como por exemplo, os da região do hipocampo (THAPALIA; ZHOU; LIN, 2014).

Portanto, a lesão ocasionada pela isquemia pode progredir continuamente por horas ou dias. Consequentemente a área de penumbra é um grande alvo para intervenção e busca de alternativas, como novas drogas e mecanismos de ação com o intuito de proteger o tecido cerebral após a isquemia (LIU et al., 2017).

Para o neurocirurgião, as duas situações mais comuns que acontecem na isquemia cerebral focal são, o vasoespasma, que ocorre logo após a hemorragia subaracnóidea, devido à ruptura de aneurismas cerebrais, e a oclusão momentânea de um vaso sanguíneo (BRASILEIRA, 2001).

A administração endovenosa de ativadores teciduais do plasminogênio, é um tratamento benéfico usualmente utilizado na prática clínica, somente em casos isquêmicos, por apresentar uma ação trombolítica. Em alguns casos, como medida paliativa, é utilizada a cirurgia descompressão em casos de edema cerebral significativo. Portanto, a compreensão dos mecanismos lesivos juntamente com os eventos celulares e moleculares associados à morte celular ocasionados pela hipóxia cerebral são de extrema importância nas estratégias terapêuticas, farmacológicas e cirúrgicas, facilitando o tratamento e diminuindo os efeitos adversos ocasionados pela doença isquêmica (GO et al., 2014).

2.2.2 Mecanismos envolvidos na isquemia cerebral

A compreensão da isquemia cerebral é de grande complexidade, devido a uma série de eventos fisiopatológicos especiais e temporais envolvidos denominados de “cascata isquêmica” (THORNTON et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

No ser humano, o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) varia entre 20-80mL/100g/min (média de 50mL/100g/min). Valores menores a este, 16-18mL/100g/min, apresenta uma ausência de sinal no exame de eletroencefalograma (EEG); porém, abaixo de 10-12mL/100g/min a homeostase iônica é ausente, levando as áreas que são perfundidas à morte celular (HEISS; HAYAKAWA; WALTZ, 1976; ZWERGAL et al., 2018).

O exame de imagem auxilia na classificação da isquemia em focal ou global, levando-se em consideração a área de tecido cerebral lesada, sendo focal quando a área lesada abrange uma região restrita do SNC e global quando é generalizada ou extensa. A isquemia cerebral focal ocorre quando a diminuição do fluxo sanguíneo compromete a integridade celular de uma região limitada do SNC, podendo causar necrose, apoptose ou ambas (ZAGHLOUL et al., 2014).

O encéfalo precisa de um alto consumo de oxigênio e glicose, que depende basicamente da fosforilação oxidativa; ou seja, da formação de adenosina trifosfato (ATP) como meio de energia. A falha bioenergética cerebral e o desequilíbrio iônico, ocorrem devido à hipoperfusão, hipóxia e à diminuição do aporte de glicose e oxigênio durante a isquemia, que resulta no acúmulo de lactato formado através da glicólise anaeróbica, levando a uma acidose metabólica e possíveis danos secundários (HERTZ, 2008)

Esta falha bioenergética ocasiona a inibição da enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, provocando grande deficiência iônica com elevação dos níveis de potássio no meio extracelular e de sódio (Na^+), cálcio (Ca^{++}) e cloro (Cl^-) no meio intracelular, promovendo o edema celular (PHAN, WRIGHT et al., 2002; HERTZ, 2008), alteração no potencial de membrana, despolarização dos neurônios e das células gliais (HERTZ, 2008; LIU et al., 2017).

Um dos principais neurotransmissores excitatórios do SNC liberado com a despolarização neuronal é o glutamato, que está envolvido em várias funções, tais como aprendizado e memória. Porém, o excesso de glutamato no meio extracelular

acarreta em morte neuronal por não conseguir ser metabolizado, envolvendo-se na fisiopatologia da isquemia cerebral (MON; DURAZZO; MEYERHOFF, 2012).

Os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) controlam a normalidade do glutamato tanto nas células da glia, bem como nos neurônios, através de cinco isoformas já conhecidas: o EAAT1, ou também conhecido como transportador de glutamato e aspartato (GLAST); EAAT2, chamado de transportador de glutamato-1 (GLT1); ambos mais envolvidos com as células astrocíticas; EAAT3, conhecido também como carreador de aminoácido excitatório-1 (EAAC1); EAAT4, envolvido principalmente com os neurônios; e o EAAT5 (BENNETT; REUTER-RICE; LASKOWITZ, 2016; MON; DURAZZO; MEYERHOFF, 2012). Estudos comprovaram que os transportadores GLT1 e GLAST são de uma extrema importância na manutenção fisiológica dos níveis de glutamato no meio extracelular, tornando-se crucial na proteção de neurônios contra a excitotoxicidade (HERTZ, 2008).

Com o desequilíbrio iônico e bioenergético desencadeados pela isquemia, a ação do glutamato é prejudicada, acarretando um fluxo reverso denominado de transporte reverso, que aumenta ainda mais os níveis de glutamato no meio extracelular. Os níveis anormais de glutamato na fenda sináptica, ocasionados pela despolarização neuronal ou pela própria falha de captação deste, resultam em um aumento da ativação dos receptores de glutamato, principalmente dos receptores ionotrópicos NMDA e AMPA (QIN et al., 2018; ZHANG et al., 2005).

Esta hiperativação glutamatérgica, gera um aumento do influxo de Ca^{++} e Na^{+} , levando a um aumento da produção de radicais livres, a um aumento do processo inflamatório, à ativação de citocinas, quimiocinas e moléculas reguladoras de transcrição que, devido à amplificação do sinal celular e ao rompimento da barreira hemato-encefálica, contribuem na progressão da lesão e, conseqüentemente na ativação de diversas vias de sinalização e de genes associados à morte celular. (DHURIYA; SHARMA, 2018; HERTZ, 2008; MON; DURAZZO; MEYERHOFF, 2012).

O rompimento da barreira hemato-encefálica gera uma infiltração de células inflamatórias periféricas no SNC, tais como granulócitos, polimorfonucleares, monócitos/macrófagos, astrócitos e células da micróglia, no local de isquemia cerebral. Devido a todas essas alterações, desbalanço na homeostase celular e ativações de enzimas e proteínas que danificam a estrutura da membrana celular, ocorre a lesão tecidual, que leva à morte celular, seja por mecanismos de necrose ou de apoptose (DHURIYA; SHARMA, 2018; PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015).

2.2.3 Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral

Pesquisas utilizando modelos experimentais com isquemia cerebral focal, hipóxia-isquêmica ou isquemia global são de extrema importância para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patologia (ANTONIO; DIAS; COLLI, 2000). Neste trabalho utilizaremos o modelo de isquemia cerebral focal.

2.2.3.1 Modelos experimentais de isquemia cerebral focal

Para obter resultados positivos nos experimentos relacionados ao processo de isquemia cerebral, os estudos utilizavam inicialmente uma craniotomia para ter acesso à ACM e seus ramos distais. Este procedimento envolvia inúmeras intercorrências, tais como a localização da incisão cirúrgica, a ligadura, a formação de trombos, eletro e termocoagulação e a oclusão permanente da ACM (HEISS; HAYAKAWA; WALTZ, 1976; JONES et al., 1981; WAHL et al., 1993). Embora a oclusão do vaso seja geralmente permanente, em alguns modelos experimentais as ligaduras são transitórias (CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001).

Outra técnica utiliza uma cânula associada a uma pequena craniotomia e ao uso de drogas vasoconstritoras, tais como a endotelina; que possui ação constritora, obstruindo o fluxo sanguíneo cerebral de forma transitória (ZHANG et al., 2005).

O meio mais comumente utilizado que apresenta todas as características clínicas, e sem o uso de uma craniotomia, é a oclusão da ACM através de um acesso na região ventral do pescoço e com a introdução de um fio obstrutor no interior da ACI (Artéria Carótida Interna), chegando até a ACM, ocasionando uma isquemia cerebral transitória e assim, a morte celular no tecido cerebral (ALBUQUERQUE et al., 2016; CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001).

2.3. Alcoolismo

O consumo do álcool na vida social é um hábito frequente mundialmente; porém, o seu consumo de forma indiscriminada, é um dos principais riscos à saúde, sendo responsável por taxas elevadas de morbidade e mortalidade. O etilismo é

considerado uma síndrome multifatorial que compromete o estado físico, social e mental da pessoa (FILIPE; POMBO, 2012).

No SNC, o etanol age como depressor, causando inicialmente uma sensação de euforia seguida de sonolência e mal-estar. Apresenta efeitos ansiolíticos e sedativos, diminuindo o tempo de reação do corpo e a resposta reflexa, produzindo até mesmo perda de coordenação motora. A sintomatologia do consumo de álcool, pode se manifestar com náuseas, vômitos, cefaléia, polidipsia e fadiga. Em doses elevadas, induz a perda de consciência, hipoglicemia e até o coma (HAES et al., 2010).

Estudos relatam que 10% da população mundial, ainda com valores crescentes, independente de sexo, raça, grau de instrução e idade, consomem abusivamente substâncias psicoativas, sendo o etanol um deles. Assim, o etanol representa um grave problema de saúde pública, sendo um grande fator de risco para a morbidade, mortalidade e incapacidade em todo o mundo, com cerca de 3,3 milhões de mortes a cada ano. Um estudo conduzido pela Universidade de Harvard e algumas instituições colaboradoras, revelaram que muitas doenças são causas parcial ou total pelo uso abusivo do etanol, tais como: transtornos físicos, doenças infecciosas, cânceres, diabetes, desordens neuropsiquiátricas, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas (cirrose), doenças pancreáticas, acidentes de trânsito, incapacidade e até mesmo doenças cerebrais (WHO, 2014).

2.3.1 Cerebelo e etanol

Por tempos, estudos tem verificado a ação do etanol no cerebelo, isto devido a sua neurofisiologia e as alterações da coordenação motora geradas pelo seu consumo (TARANUKHIN et al., 2012).

A rede neuronal cerebral permite que diversas áreas do cérebro, mesmo distantes, participem entre si através das vias e tratos, atuando no controle motor, funções cognitivas e até mesmo comportamental (CAMPOS-MOJENA et al., 2016; LIU et al., 2017).

O cerebelo tem função predominante no controle motor, emoção e na modulação cognitiva. Sendo assim, estudos sobre o impacto do etanol no cerebelo buscam elucidar alterações de coordenação, linguagem, problemas afetivos, memória e comportamento (CHO et al., 2018).

Em humanos, a abstinência do álcool acarreta déficits da conectividade funcional e comprometendo tarefas simples. Esse padrão funcional fronto-cerebelar diminuído é compatível com lesões neuropatológicas documentadas em alcoólatras e pode se refletir na disfunção cerebral associada com o alcoolismo (DIPPOLD et al., 2013; OLIVEIRA, 2002).

Estudos experimentais com ratos expostos ao consumo de etanol, mesmo que por curto período, evidenciam que o álcool pode causar apoptose de forma ampla no cérebro, desenvolvendo déficits neurocognitivos permanentes (MOON; XU; GIFFARD, 2013; XIE; ZHANG; JING, 2018).

O cerebelo é um dos órgãos que mais sofrem consequências com o uso abusivo de etanol, desencadeando alterações no metabolismo da glicose e predis põem à morte neuronal no cerebelo (OLIVEIRA et al., 2014).

Em seres humanos, disfunções motoras discretas são evidentes com o uso abuso de etanol. O uso crônico e abusivo de etanol no adulto causam mais comumente doenças debilitantes no SNC por perda da substância branca, no SNP (Sistema Nervoso Periférico) e no músculo esquelético com deficiência da função executiva. No cerebelo, a degeneração por uso excessivo de etanol ocorre principalmente no vérmis, por estar relacionado com o circuito córtico- límbico, o músculo esquelético e os nervos periféricos. O etanol atinge todas as células do SNC; porém, os astrócitos, oligodendrócitos e as terminações nervosas, sofrem um maior índice de degeneração, levando à atrofia da substância branca, inflamação neural e perda da sinaptogênese. Além disso, a degeneração neural com uso abuso de etanol predispõe a deficiência de tiamina, exercendo um efeito tóxico nas células gliais, na mielina e na microcirculação, ocasionando lesões hemorrágicas agudas e potencialmente fatais no diencéfalo e no tronco encefálico, podendo atingir o cerebelo, devido à sua proximidade anatômica (BAZOVKINA et al., 2017; FADDA, 1998).

Pesquisas analisam o etanol como agente lesivo no cerebelo de animais e do homem, nas diferentes idades e formas de exposição, revelando o impacto do etanol no cerebelo, tendo a apoptose como principal mecanismo de morte celular decorrente do consumo excessivo desta substância (DIPPOLD et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; POUSA; ABRAH, 2016; QI et al., 2014). Todavia, ainda são necessários mais estudos que possam evidenciar os mecanismos da ação do etanol na lesão cerebelar.

2.4 Apoptose Celular

O termo apoptose foi descrito por Kerr (1972) e foi utilizado para diferenciar do fenômeno de morte celular por necrose, sendo considerado como um fenômeno de morte celular programada (Figura 3) (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). A apoptose tem um papel importante no desenvolvimento e homeostasia de organismos multicelulares. Atualmente, compreende-se que no mecanismo da apoptose celular existe uma grande complexidade de genes e elementos efetores no papel da homeostase celular, estando envolvida na patogenia de várias doenças, tais como: imunes, infecciosas, cancerígenas, neurodegenerativas e na isquemia cerebral (ALBUQUERQUE et al., 2016; CHO et al., 2018; MCDANIEL et al., 2014; PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015). A maioria das mudanças que ocorrem durante a apoptose são causadas por proteases de cisteína que pertencem a uma grande família de proteínas com atividade enzimática conhecida como caspases (cisteino-proteinase-aspártico-ase) (RATHMELL; THOMPSON, 2002). As caspases são proteínas homólogas entre si, com 14 membros bem caracterizados nos mamíferos, sendo 11 no ser humano (ANAZETTI; MELO, 2007).

As caspases são divididas em duas classes, as iniciadoras e as efetoras. As caspases iniciadoras são caracterizadas por uma extensa região N-terminal (> 90 aminoácidos), enquanto as caspases efetoras normalmente contém de 20 a 30 resíduos em sua sequência de pró-domínios (ADAMS, 2003; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

A ativação das caspases efetoras (como as CASPASES 3 e 7) é feita por caspases iniciadoras (como a CASPASE 9), através da clivagem interna de resíduos específicos de ácido aspártico.

Figura 3- Diferenciação celular no processo de (a) Necrose e (b) Apoptose. (BioAgency 2004)

Na figura acima, podem-se distinguir as diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose comparado à necrose. A necrose **(a)** é caracterizada pela perda de integridade da membrana plasmática, floculação da cromatina e inchaço, seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração das organelas. O processo apoptótico **(b)** envolve alteração da permeabilidade das membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular e formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas. A apoptose pode ocorrer mais frequentemente por duas vias, uma intrínseca ou mitocondrial, e outra extrínseca ou via de receptor de morte; porém, há uma via não tão frequente, que é a via independente de caspases (CHO et al., 2018).

A via extrínseca, ou comumente conhecida como via dependente de caspase, ocorre devido a um receptor de morte, como por exemplo o Fator de Necrose Tumoral (TNF), que é dependente das proteínas caspases. Os membros da família TNF são principalmente produzidos como proteínas transmembrana de tipo II, dispostas em homotrímeros estáveis. Cada membro da família TNF liga-se a um ou mais receptores na família dos TNFR (receptores TNF). Os TNFR contêm uma a quatro cópias de um domínio rico em cisteína conservada que segue um terminal amino hidrofóbico e precede o domínio transmembrana. A ligação do ligante provoca uma infinidade de

respostas (incluindo proliferação, inflamação e apoptose) dependendo das proteínas adaptadoras que o receptor ligado recruta. O TNFR sinaliza através de duas classes de proteínas adaptadoras, fatores associados ao TNFR (TRAFs) e proteínas contendo o domínio de morte (DD). O subconjunto de TNFRs que podem ativar a apoptose também possui os DDs. O DD é um trecho conservado de aproximadamente 80 aminoácidos que é essencial para a transdução do sinal apoptótico. Os receptores de morte que parecem desempenhar papéis importantes na mediação da apoptose são aqueles que se ligam ao TNF (TNF-, TNFSF2), ao FasL (também conhecido como CD95L, TNFSF6) ou ao ligante indutor de apoptose TNFR (TRAIL; também conhecido como Apo2L, TNFSF10) (ELMORE, 2007).

A via intrínseca ou mitocondrial é ativada por uma gama de estímulos endógenos e exógenos, incluindo danos ao DNA, isquemia e estresse oxidativo. A via intrínseca é influenciada por membros da família BCL, que são receptores ligados à membrana mitocondrial, entre elas a BAX e a BCL-2, que atuam como proteínas reguladoras pró ou anti-apoptóticas, respectivamente. Nesta via, a consequência funcional da sinalização pro-apoptótica é a perturbação da membrana mitocondrial e a liberação do citocromo C (um complexo protéico) com a formação do apoptossoma, constituído por uma forma inativa de Caspase 9 e um fator ativador da protease apoptótica 1 (APAF1) no citoplasma. Este complexo hidrolisa ATP para clivar e ativar a caspase 9. O agrupamento da procaspase-9 desta maneira leva à ativação da caspase-9. A caspase iniciadora 9 então cliva e ativa as caspases executoras 3, 6 e 7, resultando em apoptose celular. As proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-XL inibem a liberação de citocromo C (Figura 4) (LORETO et al., 2014).

Recentes estudos têm verificado a importância dos genes e microRNAs no mecanismo da apoptose celular (ALBUQUERQUE et al., 2016; TIRAPELLI et al., 2010, 2011).

Figura 4. Ilustração das vias da apoptose: extrínseca (por receptores de morte) e intrínseca (mitocondrial) (TIRAPELLI, 2007 – COM PERMISSÃO).

2.5 Os MicroRNAs.

Os MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, com a capacidade de regular a expressão de genes em nível pós-transcricional através da degradação ou repressão da tradução das moléculas que são alvos dos RNA mensageiro (RNAm) (AGUIAR et al., 2010). Os miRNAs tem sido implicados na maioria das principais funções celulares, entre elas a proliferação, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e regulação transcricional (KANDA et al., 2018).

O primeiro relato sobre os miRNAs foi feito por Lee; Feinbaum; Ambros (1993), em *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Ele demonstrou as suas funções na via de degradação do miRNA ou na repressão transcricional do mesmo. Estudos recentes demonstram ácidos nucleicos fetais circulantes no plasma materno, bem como a detecção de miRNAs extracelulares circulantes no sangue, sugerindo uma ampla oportunidade para o uso de miRNAs circulantes, podendo ser utilizados como biomarcadores para o diagnóstico molecular não invasivo (QI et al., 2014; TARANUKHIN et al., 2012). Os miRNAs circulantes permanecem bastante estáveis mesmo após sofrerem condições adversas, tais como temperaturas extremas, ácidos

ou álcalis fortes e uma preservação a longo prazo. Além disso, as funções dos miRNAs também estão envolvidas na modulação de uma variedade de processos celulares e fisiopatologia, como sobrevivência neuronal, diferenciação, metabolismo, morte / apoptose, doenças cerebrovasculares e cânceres (TIRAPELLI et al., 2011).

Foi relatado que os miRNAs desempenham papéis-chave na regulação dos processos moleculares após o AVC. O presente estudo mostra a relação complexa entre miRNAs e acidente vascular cerebral (ALBUQUERQUE et al., 2016; XU et al., 2018).

2.5.1 Biogênese dos MicroRNAs

A biogênese dos miRNAs ocorre durante a transcrição no núcleo celular, sendo posteriormente exportados ao citoplasma e subsequentemente processados e maturados. Na grande maioria, a transcrição dos miRNAs é mediada pela RNA polimerase II, uma enzima que também é responsável pela transcrição de genes que codificam as proteínas (AGUIAR et al., 2010).

Os nucleotídeos dos miRNAs primários (pri-miRNA) são transcritos e formam estruturas secundárias, como as regiões “stem”, em que dois segmentos de RNA com suas bases complementares são pareados, e as regiões “loop”, nas quais os pares de bases não são complementares, constituindo, assim, alças circulares (estrutura hairpin). No núcleo, os pri-miRNA são processados por um complexo que inclui a enzima Drosha e uma proteína de ligação de RNA de dupla fita. A estrutura resultante, designada miRNA precursor (pré-miRNA), é exportada para o citoplasma por meio da exportina-5. No citoplasma, os pré-miRNAs são processados por Dicer, que remove a alça na estrutura hairpin, resultando na formação de um duplex de RNA. Este duplex de RNA é incorporado ao complexo de silenciamento induzido pelo complexo (RISC), no qual as duas fitas de RNA são separadas. Uma destas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro, ao passo que a fita complementar sofre o processo de degradação (QI et al., 2014).

A junção do miRNA com o complexo RISC (miRISC) modulará a expressão gênica por meio de dois mecanismos: degradação do RNAm e repressão da tradução do RNAm (AGUIAR et al., 2010; MOON; XU; GIFFARD, 2013) (Figura 5).

Figura 5. Biogênese do MicroRNA. (CAMPOS, 2011).

2.5.2. Os miRNAs e a Apoptose Celular

Estudos demonstraram que a expressão de miRNA pode modular a sobrevivência neuronal pós isquemia cerebral regulando os níveis de genes alvos que estão relacionados ao processo de apoptose celular (AGUIAR et al., 2010; POUSA; ABRAH, 2016).

Para Xu et al. (2018), o miR-21 é um potente fator anti-apoptótico em sistemas biológicos, onde avaliaram o aumento significativo do nível da expressão do miR-21 *in vivo* e *in vitro* após o acidente vascular cerebral isquêmico, suprimindo a morte celular neuronal através da redução do ligante Fas (FasL), um importante ligante indutor de morte celular.

Para Dippold et al. (2013), há um aumento da expressão do miR-21 durante a regeneração hepática em ratos submetidos a modelo de alcoolismo crônico.

O miR-155 também foi relatado como um importante modulador no processo de apoptose celular, regulando a expressão da caspase-3. Estudos experimentais knockdown do miR-155 reduziu significativamente a apoptose de células endoteliais microcavitárias do cérebro (XU et al., 2018).

Alguns estudos também demonstram um papel importante do miR-155 e do efeito de outros miRNAs na doença hepática alcoólica. Pesquisas demonstram que o

álcool atinge o miR-155 e induz a produção de macrófagos RAW264.7 e células de Kupffer. Um estudo experimental com camundongos alimentados com álcool concluiu que houve um aumento do TNF- α e consequentemente o miR-155 (BALA; SZABO, 2012).

O aumento da expressão do miR-126 com lentivírus exibe um papel protetor na isquemia cerebral, auxiliando nos efeitos anti-apoptóticos através da regulação negativa do nível de caspase-3 e caspase 9 (XIE; ZHANG; JING, 2018).

Ladeiro et al. (2008) verificaram através de microarray que há uma diminuição da expressão do miR-126 em pacientes com carcinoma hepatocelular.

Devido a isto, torna-se importante elucidar o papel de microRNAs que estão presentes na regulação de proteínas envolvidas no mecanismo de apoptose celular associados a isquemia cerebral assim como os possíveis danos causados pelo consumo crônico de álcool.

3. JUSTIFICATIVA

A isquemia cerebral é um problema de saúde pública, sendo a principal causa de óbito por lesões cérebro-vasculares e a principal causa de incapacidade neurológica, tendo um grande impacto socioeconômico devido às necessidades de cuidados intensivos e tratamento de reabilitação.

O cerebelo é uma estrutura do SNC que atua na coordenação de movimentos e equilíbrio. Este sofre grandes limitações durante o crescimento e a morte das células durante a isquemia cerebral, com deficiências cognitivas e motoras, mesmo que o cerebelo se encontre distante do local de lesão, podendo ser a isquemia secundária ao uso excessivo do álcool.

Estudos comprovam que o álcool consumido em pequenas doses, tem efeito neuro-protetor no SNC; porém, seu consumo abusivo, tem um efeito neuro-degenerativo. O cerebelo é uma das estruturas do SNC que mais é afetado pelo consumo excessivo do álcool, e que sabidamente, é um local onde ocorre morte do tecido cerebral.

A apoptose celular é um mecanismo fisiológico de morte celular; no entanto, quando exposta a insultos exógenos repetidamente, favorecem a apresentação aumentada deste mecanismo.

Portanto, através de um modelo de indução de isquemia focal, com a oclusão da ACM, poderemos verificar as possíveis alterações morfológicas que contribuirão no desencadeamento da apoptose celular e a neuro-degeneração do cerebelo em ratos submetidos à isquemia cerebral e ao modelo de alcoolismo crônico. Devido à escassez de trabalhos que relacionam estes dois eventos, nossos resultados poderão auxiliar na compreensão dos processos envolvidos na neuro-degeneração induzidos pela isquemia cerebral, associados ou não ao alcoolismo, em um órgão distante do foco isquêmico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral:

Este trabalho tem por objetivo analisar o córtex cerebelar de ratos submetidos a um modelo experimental de isquemia cerebral focal transitória por oclusão da ACM durante 90 minutos, seguida por reperfusão de 48 horas, associado ou não a modelo de alcoolismo.

4.2. Objetivos específicos:

- Analisar o perfil de expressão proteína de Caspase 9 relacionada ao mecanismo de apoptose no córtex cerebelar (tecido granular, molecular e nas células de Purkinje) em ratos submetidos a modelo experimental de isquemia cerebral focal transitória por oclusão da ACM durante 90 minutos, seguida por reperfusão de 48 horas, associado ou não a modelo de alcoolismo;
- Analisar o perfil de expressão dos miRs-21, -126 e -155 relacionados ao mecanismo de apoptose no cerebelo de ratos submetidos a modelo experimental de isquemia cerebral focal transitória por oclusão da ACM durante 90 minutos, seguida por reperfusão de 48 horas, associado ou não a modelo de alcoolismo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 50 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos adultos, adquiridos junto ao Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas durante o período pré-operatório (38x23x15cm – contendo no máximo 3 ratos por gaiola –) com tampa metálica tipo grade, forradas com maravalhas, tendo livre acesso à ração balanceada (Nuvilab CR1 - Nuvital®) e água. Foram mantidos no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP/USP a uma temperatura ambiente de aproximadamente 25^o C, com exaustão do ar ambiente contínuo e com ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo mensurado semanalmente o peso dos animais, nos diferentes grupos em estudo.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo número 279/2005).

5.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais:

Grupo controle (C): 10 animais. Os animais não foram submetidos ao procedimento cirúrgico e/ou ao consumo de etanol. Estes foram apenas anestesiados e, logo após o controle das variáveis biológicas, sofreram eutanásia.

Grupo Sham (S): 10 animais. Os animais foram submetidos à simulação completa do procedimento cirúrgico, com a introdução do fio obstrutor, e, logo em seguida, sofreram eutanásia.

Grupo Isquêmico (I): 10 animais. Os animais foram submetidos à isquemia focal por oclusão da ACM por um período de 90 minutos, seguido por reperusão de 48 horas e, em seguida sofreram eutanásia.

Grupo Alcoolizado (A): 10 animais. Os animais receberam diariamente etanol diluído a 20% em água por um período de quatro semanas e, em seguida sofreram eutanásia.

Grupo isquêmico e alcoolizado (IA): 10 animais. Os animais receberam diariamente etanol diluído a 20% em água por um período de 4 semanas e foram submetidos à isquemia focal por oclusão da ACM por 90 minutos, seguida por reperfusão de 48 horas. Logo após, sofreram eutanásia.

A figura 6 esquematiza a formação e a distribuição dos grupos experimentais.

Figura 6. Formação e distribuição dos grupos experimentais.

5.3 Modelo de Indução ao Alcoolismo

Para a indução do alcoolismo nos animais dos grupos A e IA, foi utilizado o modelo de “alcoolismo semi-voluntário” com a fornecimento de etanol como único alimento líquido disponível para estes animais.

Para esses grupos experimentais, foi necessária uma preparação onde os animais foram condicionados a um breve período de adaptação gradativa ao consumo de etanol, consistindo no fornecimento de etanol diluído em água com uma concentração gradativa, alterada em doses crescentes semanalmente de 5%, 10% e 20%. A fase experimental teve início apenas na terceira semana de adaptação.

5.4 Modelo de Indução a Isquemia Focal cerebral

5.4.1 Preparação do fio obstrutor e procedimentos gerais

O fio obstrutor utilizado para a isquemia cerebral através da oclusão da ACM foi preparado pela técnica de recobrir uma das extremidades com silicone (KOISUMI et al, 1986). Um dos segmentos do fio (mononylon 4-0 Ethicon) foi seccionado com 25mm e a outra extremidade foi fixada deixando-a livre. Utilizando um microscópio cirúrgico (modelo D. F. Vasconcelos), a extremidade livre do fio foi recoberta com uma camada de silicone, preparado pela mistura de silicone (*Silon F – Dimetil Polisiloxano*, Aroma de Menta e Corante Artificial) e do catalisador (*Silon C – Octoato de Estanho e Silicato de Etila da Herp Produtos Dentários Ltda*), na proporção de 5:1. Após este preparo, a mistura foi colocada no fio com o auxílio de uma pinça de microcirurgia. Com um paquímetro, a extensão da camada de silicone foi medida em 5 mm de comprimento e 0,28 mm de espessura, aproximadamente. Os fios foram mantidos na mesma posição por um período de 24 horas para complementação da polimerização do silicone. Os fios que não atingiram os critérios foram desprezados.

Para verificação da adequação da camada de silicone, foi realizado um teste com a dissecação da ACI em ratos previamente sacrificados. Foi retirado a calota craniana, juntamente com seus envoltórios, expondo o cérebro do animal, mas mantendo preservada toda a base do crânio. Os fios foram introduzidos por uma incisão na ACI na região cervical até o final de sua progressão, e visualizados na base do crânio. Com o auxílio do microscópio, foi realizado um ligeiro afastamento do encéfalo, para verificar a sua posição em relação ao óstio da ACM. A posição ideal considerada para o fio, foi no qual sua extremidade ficou situada logo após a origem da ACM, evitando a entrada de sangue neste vaso, tanto proveniente da artéria carótida interna homolateral, quanto retrogradamente da artéria cerebral anterior (ACA).

5.4.2. Procedimento Cirúrgico

5.4.2.1. Procedimentos Gerais

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Neurocirurgia Experimental do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do

Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram selecionados aleatoriamente em seus respectivos grupos previamente à cirurgia.

Os procedimentos técnicos foram descritos por Carlotti Jr, Colli e Kazuo (2001): cada animal foi anestesiado por inalação de halotano sob uma campânula de vidro. Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em uma prancha de madeira e, com a língua tracionada externamente, foi realizado a intubação com a cânula orotraqueal. A cânula foi conectada a um respirador para animais de pequeno porte (CR-BION – Ribeirão Preto, Brasil) e iniciou a vaporização do halotano através desta para o início da realização do procedimento cirúrgico. A cauda do animal foi dissecada, e após a localização da artéria da cauda foi introduzido uma cânula com um cateter para coletas de amostras sanguíneas para realização da gasometria (gasômetro portátil modelo *I-STAT portable clinical analyse* – ABBOTT Laboratories Inc.) com utilização de cartucho *I-STAT cartridge cg8+*) para dosagens de paCO_2 , paO_2 , do pH e a glicemia, sendo 15 minutos após de ventilação mecânica e, 15 minutos antes do término da isquemia. (Figura 7).

Figura 7. Animal em decúbito dorsal fixo na prancha de madeira após intubação e conectado ao respirador (R) para pequenos animais.

5.4.2.2. Procedimentos para indução da isquemia

Inicialmente ao procedimento cirúrgico, foi realizada a tricotomia da região cervical ventral com uma lâmina de bisturi número 12 e, em seguida, uma incisão mediana da pele, tela subcutânea e do músculo platísma para exposição das glândulas salivares e, principalmente, da camada muscular profunda, formada medialmente pelo músculo esterno-hióideo, infero-lateralmente pelo músculo esternomastóideo e superiormente pelo músculo omo-hióideo (Figura 8).

Figura 8. Desenho (A) e foto (B) ilustrando a exposição dos músculos cervicais superficiais. A. No antímero direito: glândula parótida (GP); glândula sublingual (GL); glândula submandibular (GS). No antímero esquerdo: músculo digástrico (D); músculo esterno-hióideo (EH); músculo esterno-mastóideo (EM); músculo masséter (M); músculo omo-hióideo (OH); músculo trapézio-clavicular (TC). (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

Com o auxílio de dois afastadores do tipo gancho, foi exposto o campo cirúrgico e utilizando um microscópio cirúrgico (modelo DF-Vasconcelos – aumento de 16x), a artéria carótida comum esquerda (ACC-E) foi identificada e exposta. Para esta exposição, há a necessidade de uma incisão ainda maior, após sua dissecação até a bifurcação nos seus

ramos terminais denominados artéria carótida interna (ACI) e artéria carótida externa (ACE).

Após a identificação da ACE, esta foi dissecada cranialmente e seus ramos foram coagulados e seccionados (Figura 9).

Figura 9. (A) Desenho e (B) fotografia representando a exposição das artérias: carótida comum esquerda (CCE), carótida interna esquerda (CIE) e carótida externa esquerda (CEE), com dois dos seus ramos cervicais (*), após afastamento da musculatura cervical superficial. (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

A ACI e seu ramo pterigopalatino também foram dissecados cranialmente. Proximal a bifurcação dos ramos da ACC e a ACI, no sentido cranial, a artéria pterigopalatina foi clampada temporariamente para a interrupção do fluxo sanguíneo na região.

Utilizando um fio de algodão (4-0 – *Ethicon*), a ACE foi ligada o mais cranialmente possível, e em seguida seccionada. Foi realizado o rebatimento do coto caudal, no sentido distal, para a introdução retrógrada do fio obstrutor de mononylon 4-0 (2,5cm de comprimento) com a extremidade engrossada com mistura de silicone (por KOIOSUMI et al., 1986); modificada por Carlotti Jr; Colli e Kasuo (2001) em direção à ACI. A progressão do fio na ACI ocorreu livremente após a retirada do microclipe que ocluía este vaso, até sentir resistência da sua progressão. Os microclipes da ACC e da APP permaneceram no local (Figura 10).

Figura 10. Fotografia mostra a introdução do fio obstrutor (seta) no interior da ACEE em direção à ACCE e ACIE, após retirada do microclipe da ACIE (*) para passagem do fio. Clampagem da ACCE e APPE. (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

Logo em sequência, a distância da bifurcação da ACC-E até o coto proximal do fio obstrutor foi mensurada, com o valor aceitável entre 0,5 – 0,7 cm, indicando, portanto, a medida do segmento do fio entre a bifurcação da ACC e a sua extremidade distal de 18 a 20mm. Estes valores, indicam que o fio penetrou o suficiente para ocluir o óstio de origem da ACM (CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001; KOIOSUMI et al., 1986) (Figura 11).

Com o fio, o coto da ACE foi ligado para evitar o refluxo de sangue. Neste determinado momento, o microclipe da ACCE foi retirado, permitindo sua reperusão.

Figura 11. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME (M) (no detalhe superior direito) e a ligadura da ACE-E na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). Por fim, a reperfusão da ACC-E (C) é permitida após a retirada do seu microclipe. Artéria carótida interna esquerda (I); artéria cerebral anterior esquerda (A); artéria pterigopalatina esquerda (P). (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

Os cliques das artérias carótida comum e pterigopalatina também foram retirados e, após 90 minutos de isquemia, foi retirado o fio obstrutor, recolocando o clipe temporário na ACC e na ACI, evitando o fluxo de sangue na primeira artéria e o refluxo na segunda respectivamente. Após a ligação definitiva do coto proximal da ACE com o fio (fio de algodão 4-0 *Ethicon*), os cliques foram retirados. Finalizando, a pele e tela subcutânea foram fechadas com fio mononylon 3-0.

Os parâmetros vitais do animal ainda continuaram sendo monitorados e, em seguida, foi realizada a sutura contínua da pele com fio mononylon 5-0. Uma vez o animal estável, foi retirado o halotano (anestésico inalatório), permitindo sua recuperação e, após a respiração espontânea, a cânula orotraqueal também foi retirada, e o animal foi recolocado na sua gaiola plástica, com oferta livre de água e ração. Os animais dos grupos I e IA permaneceram durante 48 horas nas gaiolas antes da eutanásia.

A eutanásia foi realizada por inalação maciça de halotano, para que então o material fosse coletado para o estudo.

5.4.3 Retirada do encéfalo e coleta do cerebelo

A eutanásia dos animais obedeceu ao tempo experimental apropriado para cada grupo, com suas particularidades.

Em decúbito dorsal, em uma placa de Petri, iniciou a retirada do encéfalo com o auxílio de uma tesoura de Mayo, com um corte transversal na região nuchal para a separação da cabeça e da região cervical da coluna vertebral. Logo em seguida, através de um corte interorbital (Figura 12) e um corte sagital occipito-frontal, permitiu o afastamento lateral dos ossos, por meio de tração digital auxiliado com pinças hemostáticas. Com o encéfalo exposto e a secção dos nervos cranianos, a sua remoção é feita cuidadosamente em bloco, e posicionado em um molde de aço (modelo *Matrix – ASI – Instruments – CBM – 2000C U.S.A.*), que é utilizado para a realização de secções coronais de 2mm.

Figura 12. Corte interorbital para retirada do encéfalo.

Para o estudo de imunohistoquímica (IH), foi utilizado apenas um dos cortes coronais, cuja secção foi realizada utilizando a região média do cerebelo (Figura 13).

Figura 13. Encéfalo isolado demonstrando a região de secção coronal do cerebelo (pontilhado).

Após a obtenção do corte coronal, a amostra do tecido cerebelar foi imerso em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,3 em temperatura ambiente para o estudo imunohistoquímico.

5.5 Procedimentos para análise do cerebelo

Após coletadas, as amostras foram encaminhadas para inclusão em parafina, seccionadas em cortes coronais a 5µm para preparação das lâminas de imunohistoquímica.

5.5.1 Análise imunohistoquímica da proteína CASPASE 9

A análise da expressão protéica foi realizada em cinco animais por grupo, e em cada lâmina de reação imunohistoquímica, foram selecionados dois campos em aumento de 400x, onde havia maior concentração de células positivas ou marcadas (áreas de “hot spots”) para a proteína em estudo. A partir da contagem do número total de células positivas e negativas nas camadas granular e molecular e nas células de Purkinje, foi calculada a porcentagem de células positivas.

As amostras foram submetidas à análise imunohistoquímica pelo método de avidina-biotina-peroxidase (*Novostain Super ABC Kit – universal, NCL-ABCu, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, Reino Unido*) – (*Kit mach 4 universal BIOCARE*),

e incubação do tecido cerebelar com anticorpo relacionado ao mecanismo de apoptose da proteína Caspase 9.

Inicialmente, cortes de 4µm de espessura foram obtidos com um micrótomo rotativo Reichert Jung 2040 (Reichert Microscope Services, Depew, Nova Iorque, EUA) e montados em lâminas histológicas pré-tratadas com silano (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA*) diluído em acetona. Em seguida, foi realizada a desparafinização com xilol e hidratação pela passagem sucessiva por soluções de etanol com concentrações decrescentes de 100 a 50%, terminando em água destilada. Após, foi realizada a inativação de peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v), seguida pela recuperação antigênica por calor úmido com uma panela a vapor *Optistream Plus (Krups North America Inc., Millville, Nova Jérsei, EUA)* com tampão citrato a 10 mM com pH 6,0 por 35 minutos.

Para bloquear as ligações inespecíficas, as amostras foram imersas em soro normal de cavalo diluído em uma solução de leite em pó Molico (Nestlé Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) a 1,5% em tampão fosfato a 0,001 M com pH 7,2 (*phosphate buffer solution* – PBS) por quatro horas à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com o anticorpo primário CASPASE 9 (*Santa Cruz*), diluído a 1/300 em solução de PBS em albumina bovina sérica (*bovine serum albumine* – BSA) a 1,5%;

Na sequência, foi realizado o bloqueio da biotina endógena (*Biotin Blocking System, Dako North America Inc., Carpinteria, EUA*) e, somente então, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário do kit *MACH 4 Universal HRP-Polymer (M4BD534, Biocare Medical)* e em seguida com avidina-biotina-peroxidase do mesmo kit (1/200 em PBS).

Por fim, as reações foram reveladas com solução de diaminobenzidina (3, 3' - *Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA*) e os cortes foram contra-corados com hematoxilina de *Harris*. Entre os passos descritos de incubação do anticorpo primário, bloqueio de biotina endógena, incubação do anticorpo secundário e complexo avidina-biotina-peroxidase, foram realizados quatro banhos com solução de *Tween 20 (Acros Organics, Geel, Bélgica)* a 0,3% em tampão Tris a 0,05 M com pH 7,6; seguidos de um banho de PBS por cinco minutos cada.

As secções foram desidratadas em etanol, diafanizadas com xilol e montadas sob lamínula com líquido *Permount (Fischer Scientific Company LLC, Fair Lawn, Nova Jérsei, EUA)*.

Após o término das reações imunohistoquímicas, as lâminas foram analisadas utilizando o microscópio Zeiss®, modelo *Axioskop 2 plus*, em aumento de 400 vezes. As imagens dos campos utilizados para quantificação da CASPASE 9 foram registradas pela câmara (*Axio Cam Hrc* ®) acoplada ao microscópio, sendo posteriormente arquivadas pelo programa *Axio Vision 6.0*®.

5.5.2 Análise por PCR em tempo real dos microRNAs

5.5.2.1 Análise da expressão gênica sérica dos microRNAs

Para a análise da expressão gênica, 1ml de sangue foi coletado em um único momento para os cinco grupos em estudo. Assim, para os animais dos grupos C, S e A, a amostra de sangue foi coletada com o animal anestesiado a partir da artéria ventral da cauda após sua canulação. Para os animais dos grupos I e I+A, a coleta foi realizada 15 minutos antes do término do período de isquemia (momento em que também foi coletado amostra de sangue para a segunda gasometria).

5.5.2.2 Extração de RNA

As amostras de sangue foram coletadas em tubo com EDTA e centrifugadas 10' por 2500 rpm e o "buffy coat" foi transferido para um tubo de 15ml. A seguir, foi lavado com tampão para lise de glóbulos vermelhos e mantido por 15' em gelo. Na sequência, seguiu-se mais uma centrifugação e mais uma lavagem com tampão lise de glóbulos vermelhos. Para a obtenção do pellet, a amostra foi centrifugada por 10' a 2500 rpm.

Adicionou-se 250l de PBS (phosphate-buffered saline) e 750µl de Trizol (Invitrogen, EUA) para congelamento a -80 °C.

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA.

5.5.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) dos miRNAs

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do miRNA, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de RT Buffer;

seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de Primers específicos (miRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e, em seguida, realizada a 4°C. Para o PCR em tempo real, foi utilizado 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

5.5.2.4 PCR em tempo real

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a expressão diferencial do miRNA-21, miRNA – 126 e miRNA 155. A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems).

Foi utilizado o sistema disponível comercialmente TaqMan Assay-on-demand, composto por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems) para a análise quantitativa da expressão dos miRNAs analisados.

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normalizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um gene house-keeping (neste caso o U6 para o miRNA na mesma amostra, originando o chamado ΔCT . Os valores de ΔCT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT do calibrador (neste caso utilizamos a média das amostras do grupo controle) resulta no $\Delta\Delta CT$. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata. A amplificação foi realizada em um volume final de 10µl, utilizando 5µl do reagente específico Taqman Master Mix, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied

Biosystems) foi utilizado juntamente com o software Sequence Detection System para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de Δ CT. O software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA), foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística.

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS “software package”.

5.6 Análise Estatística

Para a avaliação imunohistoquímica e gênica, a análise estatística foi realizada utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de comparação múltipla de *Dunns*. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*, (*GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA*), sendo considerado estatisticamente significativo quando valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Histologicamente, o córtex cerebelar consiste de duas camadas, sendo uma camada granular interna e uma camada molecular externa, separadas por um estrato incompleto de células de Purkinje, descrita por alguns autores como a terceira camada (Figura 14).

Figura 14. Fotomicrografia da visão geral de duas folhas cerebelares do hemisfério cerebelar esquerdo com marcação nuclear positiva para CASPASE 9, demonstrando as regiões da camada molecular (CM), camada granular (CG) e células de Purkinje (CP) (seta). 100x.

6.1. Análise imunohistoquímica de CASPASE 9

6.1.1 Análise da Porcentagem de Células Positivas do Tecido Molecular

Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína CASPASE-9 no tecido molecular em todos os grupos analisados (Figura 15). Houve maior significância estatística quando comparamos o Grupo Controle x Isquêmico ($p=0.002$), Controle x Isquêmico + Alcoolizado ($p=0.008$) e Sham x Isquêmico ($p=0.019$), pós teste de Dunns (Gráfico 1).

Caspase 9 - Tecido Molecular

Gráfico 1. Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão protéica de CASPASE-9 no tecido molecular dos animais dos grupos estudados. Foi observada diferença estatística na comparação entre os grupos CxI ($p=0.002$), CxI+A ($p=0.008$) e SxI ($p=0.019$), pós teste de Dunns

Figura 15. Fotomicrografias de visão da camada molecular do hemisfério cerebelar esquerdo com marcação nuclear positiva para CASPASE 9 – 400x (A – Grupo Controle, B- Grupo Sham, C- Grupo Isquêmico, D- Grupo Alcoolizado e E- Grupo Isquêmico + Alcoolizado), com setas demonstrando marcação positiva nuclear na fotomicrografia E.

6.1.2 Análise da Porcentagem de Células Positivas do Tecido Granular

Foi observada marcação positiva nuclear no tecido granular para a proteína CASPASE-9 em todos os grupos analisados (Figura 16). A comparação entre os grupos identificou um aumento significativo na expressão protéica de CASPASE-9 nos grupos Isquemia e Isquemia + Alcoolizado quando comparado com os demais grupos ($p=0,0002^{***}$ teste Kruskal-Wallis). Comparando os grupos isoladamente, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle x Isquêmico ($p=0.0198$), entre os grupos Controle x Isquêmico+Alcoolizado ($p=0.0006$) e entre os grupos Sham x Isquêmico+Alcoolizado ($p=0.0080$), pós teste de Dunns (Gráfico 2).

Gráfico 2. Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão protéica de CASPASE-9 no tecido granular nos animais dos grupos estudados. Foi observada diferença estatística na comparação entre os grupos CxI ($p=0.0198$), entre os grupos CxI+A ($p=0.0006$) e entre os grupos SxI+A ($p=0.0080$), pós teste de Dunns.

Figura 16. Fotomicrografias de visão da camada granular do hemisfério cerebelar esquerdo com marcação nuclear positiva para CASPASE 9 – 400x (A – Grupo Controle, B- Grupo Sham, C- Grupo Isquêmico, D- Grupo Alcoolizado e E- Grupo Isquêmico + Alcoolizado), com setas demonstrando marcação positiva nos diferentes grupos.

6.1.3 Análise da Porcentagem de Células Positivas nas Células de Purkinje

Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína CASPASE-9 nas células de Purkinje em todos os grupos analisados (Figura 17). A comparação entre os grupos mostrou aumento significativo na expressão protéica de CASPASE-9 entre os grupos Controle x Isquêmico ($p=0.034$), entre os grupos Controle x Isquêmico + Alcoolizado ($p=0.0059$) e entre os grupos Sham x Isquêmico + Alcoolizado ($p=0.017$) no teste Kruskal-Wallis, pós teste de Dunns (Gráfico 3).

Gráfico 3. Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão protéica de CASPASE-9 nas células de Purkinje nos animais dos grupos estudados. Foi observada diferença estatística na comparação entre os grupos Cxl ($p=0.034$), entre os grupos Cxl+A ($p=0.0059$) e entre os grupos Sxl+A ($p=0.017$) no teste Kruskal-Wallis, pós teste de Dunns.

Figura 17. Fotomicrografias de visão das células de Purkinje do hemisfério cerebelar esquerdo com marcação nuclear positiva para CASPASE 9 – 400x (A – Grupo Controle, B- Grupo Sham, C- Grupo Isquêmico, D- Grupo Alcoolizado e E- Grupo Isquêmico + Alcoolizado), com setas demonstrando marcação positiva nos diferentes grupos.

6.2 Análise da expressão sérica dos miRNAs

6.2.1 Análise da expressão sérica do miRNA-21

A expressão sérica do miR-21 está representada no gráfico 4, mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. A expressão foi maior nos animais dos grupos C e I, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,3325$, teste Kruskal-Wallis).

Gráfico 4. Representação da média e desvio padrão da expressão sérica do miRNA-21 entre os grupos estudados, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,3325$, teste Kruskal-Wallis).

6.2.2 Análise da expressão sérica do miRNA-126

A expressão sérica do miR-126 está representada no gráfico 5, mostrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham x Isquêmico e Sham x Alcoolizado ($p < 0,05$, teste Kruskal-Wallis).

Gráfico 5. Representação da média e desvio padrão da expressão sérica do miRNA-126 entre os grupos estudados, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos SxI e SxA ($p < 0,05$, teste Kruskal-Wallis).

6.2.3 Análise da expressão sérica do miRNA-155

A expressão sérica do miR-155 está representada no gráfico 6, mostrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle x Alcoolizado, Sham x Alcoolizado e Sham x Isquêmico + Alcoolizado ($p < 0,05$, teste Kruskal-Wallis).

Gráfico 6. Representação da média e desvio padrão da expressão sérica do miRNA-155 entre os grupos estudados, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos CxA, SxA e Sx I+A ($p < 0,05$, teste Kruskal-Wallis).

7. DISCUSSÃO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) ainda é considerado a segunda causa de morte em todo o mundo e a primeira causa de incapacitação em adultos (DONNAN et al., 2008). O forma isquêmica do AVC ocorre em cerca de 80% dos casos, causando sequelas que variam dependendo da localização e da área cerebral acometida pela supressão do oxigênio e também, o tempo de atendimento do paciente, o que pode ocasionar alterações motoras, sensoriais, afasia, prejuízo na orientação espacial e déficits de memória (BOKURA; ROBINSON, 1997; BRADVIK; SONESSON; HOLTAS, 1989; GODEFROY et al., 1994).

Devido a estes fatores, os modelos experimentais com eventos isquêmicos com meios de reperfusão cerebral têm sido utilizados para estudos. Atualmente existem modelos experimentais de lesão isquêmica focal ou global no SNC. Diversos modelos de isquemia/reperfusão cerebral com o uso de ligaduras das ACCs foram propostos em ratos; porém, os mesmos relatam insucesso na técnica devido a vasta circulação colateral evidenciada nestes animais através do circuito arterial cerebral, das anastomoses terminais e dos ramos corticais provindos do sistema carotídeo interno e externo (BARTEL, 2004; POWERS et al., 2016).

Vários animais têm sido utilizados com finalidade do estudo da isquemia cerebral experimental; porém, dentre eles, destaca-se o rato, devido ao seu baixo custo, fácil manuseio e obtenção da homogeneidade na sua semelhança anatômica vascular do encéfalo entre eles e entre a espécie humana (CARLOTTI Jr., 1998; NISHIGAYA et al., 1991; NISHINO et al., 1994; COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr., 1998; GREENE, 1963; SILVA, 1998).

Entre os mecanismos de infartos cerebrais, a oclusão da ACM é a mais comum. Vários são os métodos descritos para OACM em ratos. O método de Koizumi (1986) consiste na craniotomia e coagulação da ACM, com ocorrência de isquemia cerebral em cerca de 90% dos animais; porém, a oclusão irreversível da ACM não permite a este modelo verificar o mecanismo de reperfusão, um evento importante na condição clínica. O método de Longa (1989) consiste em introduzir fio cirúrgico na ACI até a ACM. Este modelo evidenciou isquemia cerebral em 56% dos casos; porém, a taxa de mortalidade também é significativa. Este modelo permite avaliar o evento de reperfusão da área isquêmica, uma vez ocorre a retirada do fio obstrutor e a

reperfusão cerebral. Esse modelo de estudo permite diferenciarmos vários tempos de isquemia.

O modelo experimental de isquemia cerebral utilizado foi descrito por Carloti et al. (2001) e consiste no preparo de um fio obstrutor com uma camada de silicone e este é introduzido inicialmente através de uma incisão na região anterior cervical através da ACEE e posteriormente na ACIE, ocasionando a supressão do suporte sanguíneo na ACM, preservando assim o encéfalo no interior da cavidade craniana do rato e diminuindo significativamente o número de óbitos nos animais estudados.

Visto que os danos causados pela isquemia cerebral focal também são observados em regiões externas à área do foco isquêmico, este estudo investigou a possível contribuição da apoptose à neurodegeneração na camada molecular, camada granular e nas células de Purkinje do cerebelo de animais submetidos à isquemia focal a partir da oclusão da ACM (NAKKA et al., 2008; CARVALHO et al., 2016).

Jeng-Hsiung et al. (2005) realizaram estudo com modelo experimental de isquemia cerebral focal através da oclusão permanente da artéria carótida comum direita em ratos com sete dias de vida. Este trabalho analisou amostras de tecido cerebelar e do tronco encefálico pela técnica 2-deoxiuridina 5-trifosfato-biotina (TUNEL) verificando as células positivas à apoptose. Na camada germinativa do cerebelo, foi observado grande número de células positivas; assim como na camada granular; porém, nessa última, as células positivas observadas se encontravam de forma dispersa no tecido. Algumas células evidenciaram morfologia necrótica, edema celular e aumento do seu tamanho, enquanto outras eram menores e com morfologia apoptótica como pela presença de corpos apoptóticos. Na camada molecular do cerebelo, o número de células apoptóticas foi significativamente maior quando comparado às células necróticas. Entretanto, na camada granular, o número de células apoptóticas e células necróticas foram semelhantes. Esses achados indicaram que o mecanismo de apoptose foi desencadeado no cerebelo e no tronco encefálico que são regiões distantes da região isquêmica primária. Portanto, os autores concluíram que, embora o cerebelo e o tronco encefálico estejam fora do suprimento vascular da artéria cerebral média, estas regiões sofreram as ações da neurodegeneração.

Estudos evidenciam que fatores externos contribuem para o aumento da probabilidade da ocorrência de isquemia cerebral, entre eles encontramos fatores

genéticos, hormonais e ambientais. Dentre os fatores ambientais, enfatizamos o diabetes melitus, tabagismo, obesidade, sedentarismo e o uso abusivo de álcool. (PENTNEY & DLUGOS, 2000).

O consumo abusivo de etanol promove lesões hepáticas e esteatose hepática persistente, promovendo a lipólise e aumentando lipídios tóxicos na corrente sanguínea. 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 sequência 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, aumentando o nível de apoptose celular e neurodegeneração.

A apoptose é um processo complexo e rigorosamente regulado que ocorre passo a passo através de uma ativação consecutiva de proteínas específicas que destroem a célula (HOTCHKISS et al. 2009).

Em nosso estudo, analisando a expressão da Caspase-9, observamos que houve aumento significativo nas três camadas do córtex cerebelar analisadas (camada molecular, camada granular e células de Purkinje).

Na camada molecular, houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos CxI, CxI+A e SxI. A principal constituição da camada molecular são suas fibras, devido à disposição paralela e conter células dispostas tanto no estrato externo, região de pequenos axônios ramificados, ou células estreladas; e no estrato interno, onde há células em cesto, onde estes axônios que percorrem paralelamente à superfície da folha, emitindo fibras colaterais que dirigem conexões com as células de Purkinje e se ramificam em rede ao redor dos corpos destas células, tendo a forma de um cesto (KIERNAN, 2003; MACHADO, 2006).

Na camada granular observamos diferença estatisticamente significativa na expressão protéica de CASPASE-9 entre os grupos CxI, CxI+A e entre os grupos SxI+A. A camada granular é constituída por uma grande quantidade de pequenas células nervosas com citoplasma reduzido, denominadas células granulares. Apresentam um formato esférico, providos de curtos dendritos e de um axônio que atravessa a camada de células de Purkinje, realizando inúmeras sinapses com esta

camada e a camada molecular, percorrendo a folha. Na região externa da camada granular há células de Golgi, em menor quantidade comparado às granulares, cujos dendritos ramificam-se na camada molecular e os axônios na camada granular (KIERNAN, 2003; MACHADO, 2006).

Nas células de Purkinje foi observada marcação positiva nuclear para a proteína CASPASE-9 com diferença estatisticamente significativa entre os grupos CxI, CxI+A e SxI+A. As células de Purkinje são constituídas por grandes corpos celulares piriformes, situando-se entre as camadas molecular e granular. Elas apresentam dendritos que se ramificam na camada molecular formando uma gama de arborizações e um axônio que se dirige opostamente para a camada granular, terminando nos núcleos centrais do cerebelo (KIERNAN, 2003; MACHADO, 2006).

Nowoslawski et al. (2005), em um estudo experimental com indução de isquemia cerebral através da oclusão da ACM em ratos, verificou em áreas cerebrais isquêmicas que a ruptura da membrana mitocondrial e liberação de citocromo C, proteína específica na formação do apoptossoma, ativa a caspase- 9 e essa, conseqüentemente, a ativação da caspase-3, gerando uma fragmentação do DNA, promovendo a morte celular pelo mecanismo de apoptose.

Luo (2010), relata sobre o efeito tóxico do etanol em células granulares do cerebelo (CGC). Os mecanismos de apoptose celular são complexos e podem ocorrer pela ativação da via intrínseca de apoptose com inibição das sinalizações anti-apoptóticas. Vários mecanismos para indução de apoptose em CGC associada ao etanol foram sugeridos: inibição de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), sinalizadores da ativação neurotrófica, estresse oxidativo induzido pelo acúmulo de oxigênio intracelular reativo (ROS), do ácido retinóico, a diminuição de tiamina, deficiência dos canais de potássio, entre outros.

Carvalho et al., (2016), analisaram a expressão da CASPASE-3, BCL-2 e XIAP em cerebelos de ratos controle e alcoolizados submetidos à isquemia cerebral focal através da oclusão da ACM por um período de 90 min seguido de reperfusão por 48 horas. Neste estudo observaram que a expressão das proteínas CASPASE-3 e BCL-2 foi maior nas camadas granular e molecular do córtex cerebelar nos grupos experimentais tratados: isquêmico, alcoolizado e isquêmico+alcoolizado, confirmando sinais de apoptose no córtex cerebelar, mesmo sendo este, uma estrutura distante do foco isquêmico.

Nos últimos anos, centenas de genes foram encontrados associados à patogênese do AVC, mas apenas alguns demonstraram que estes podem influenciar sua suscetibilidade (Yi et al., 2013). Além disso, muitos estudos focaram nos efeitos dos microRNAs (miRNAs) no AVC, pois estudos prévios demonstraram que a expressão do miRNA está relacionada com o prognóstico desta condição (POWERS et al., 2016)

Estudos também relataram que os miRNAs influenciam no processo de apoptose celular. A via extrínseca é conduzida pela ativação de receptores de morte na superfície celular, entre eles estão o Fator de Necrose Tumoral (TNF) - α , Fas e receptores de TNF, indutores de apoptoses; enquanto a via intrínseca está relacionada à via de sinalização mitocondrial (STYLLI et al., 2017). O curso induz em um influxo maciço de Ca^{+} , que leva à liberação do citocromo C mitocondrial ou fator indutor de apoptose (AIF) (XIAN et al., 2016). O citocromo c se liga ao fator-1 ativador da protease apoptótica e à pro-caspase9 para formar um apoptossoma que ativa caspase-9 e subsequentemente, caspase-3, levando ao dano do núcleo do DNA e finalmente à morte celular.

Muitos estudos demonstraram que a expressão de miRNAs poderia modular a sobrevivência neuronal pós AVC regulando os níveis de genes alvo. (AUMILLER V, FÖRSTEMANN, 2008)

Liu et al., (2017) relataram que o miR-298 foi expresso no tecido cerebral e em amostras de sangue em modelos experimentais após AVC isquêmico e hemorrágico.

Em nosso estudo, analisamos a expressão dos miRNAs- 21, - 126 e -155 no sangue dos animais.

O miR-21 é relatado com função anti-apoptótica em sistemas biológicos. Buller et al (2010), avaliaram o nível de expressão de miR-21 *in vivo* e *in vitro*. Os resultados demonstraram que a expressão de miR-21 aumenta significativamente após AVC isquêmico através da supressão de células neuronais por meio da redução do ligante Fas (FasL) G, um importante ligante indutor de morte celular⁴³.

Estudos relatam que o miR-21 está envolvido na regulação da angiogênese, auxiliando na proliferação endotelial e limita a aterosclerose pela supressão da Dlk1 (LEE et al., 1993) Além disso, o nível sérico de miR-21 juntamente com o miR-126 estavam significativamente aumentados em pacientes com AVC isquêmico e aterosclerose (REDELL, LIU, DASH PK, 2009).

Em nosso trabalho, a expressão sérica do miR-21 não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, mas verificamos que houve aumento no grupo I, quando comparado ao grupo C. O mecanismo exato das alterações na expressão dos miRs-21 e -126 permanece incerto e os fatores genéticos podem desempenhar papéis-chave nesse processo.

O miRNA-126 regula a resposta das células endoteliais, modulando a angiogênese e contribuindo para a homeostase endotelial juntamente com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Essa função é exercida provavelmente pela ação do MirRNA-126 através da inibição dos reguladores negativos da via do VEGF, tais como a proteína 1 contendo o domínio EVH1 relacionado ao Sprout (SPRED1) e a subunidade reguladora 2 do fosfoinositol-3 quinase (PIK3R2) (TAN et al., 2009). O miRNA-126 é, portanto, um fator importante que poderia manter a integridade vascular.

A superexpressão do miR-126 com lentivírus exibe um papel protetor na isquemia cerebral hemorrágica e apresenta efeitos anti-apoptóticos através da regulação negativa do nível de caspase-3 (KONG et al, 2017).

Qui et al. (2018), verificaram que a o miRNA-126 influenciou na expressão do fator 1 derivado de células estromais (SDF-1). Nas células endoteliais normais, o miR-126 reprimiu a síntese de SDF-1 por ligação direta ao mRNA de SDF-1. O nível normal de miR-126 foi suficiente para modular a expressão da SDF-1 e através desta molécula juntamente com a adesão celular vascular 1 (VCAM-1). Sob altas concentrações de glicose associada à disfunção das células endoteliais, a diminuição do miR-126 poderia aumentar a expressão de SDF-1 e também diretamente a migração e adesão de células progenitoras, melhorando ainda mais o resultado do AVC por meio da diferenciação em células endoteliais.

Cardoso et al. (2012), afirmaram que as células endoteliais auxiliam na melhora da recuperação isquêmica por diferenciação das células endoteliais. Nij et al. (2015), relataram que células progenitoras segregaram IL-8 para auxiliar na promoção da angiogênese durante a isquemia. Como resultado, o SDF-1 poderia ser regulado positivamente e recrutar células progenitoras para a área danificada (KIKKAWA et al., 2017).

Na condição isquêmica renal, a superexpressão do miR-126 no compartimento hematopoiético pode diminuir a expressão do CXCR4 nas células-tronco da medula óssea e, ao mesmo tempo, aumentar o SDF-1 no tecido isquêmico. Em conjunto, o

miR-126 desempenha um papel protetor durante a lesão isquêmica e é um alvo potencial para a terapia isquêmica do AVC.

Em nosso estudo, a expressão sérica do miR-126 mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos SxI e SxA.

O miR-155 também foi relatado exercendo um importante papel na modulação da apoptose celular, regulando a expressão de Caspase-3. Este miRNA tem um papel multifuncional implicado na regulação de vários processos fisiológicos e patológicos, tais como diferenciação de linhagem hematopoiética, imunidade, inflamação, câncer e doenças cardiovasculares, incluindo células B, células T, monócitos e granulócitos, bem como células endoteliais e células musculares lisas do vaso (FARAONI et al., 2009; O'CONNELL et al., 2010; LANDGRAF et al., 2007; SUN et al., 2012).

Entre outras funções, o miR-155 está envolvido na regulação da função endotelial e vascular (SUN et al., 2012; WEBER et al., 2014). A sua baixa regulação é acompanhada pela redução da inflamação e processos de regeneração (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2011; MURUGAIYAN et al., 2011; VAN SOLINGEN et al., 2014). Além dessas funções, o miR-155 está envolvido na progressão de múltiplos distúrbios do SNC.

Roitbak et al., (2011), em um estudos *in vitro* identificaram o miR-155 como um potente regulador da morfogênese endotelial, sendo um inibidor específico das células endoteliais na formação de novos vasos no encéfalo de ratos. Ainda neste estudo, os autores relataram que a inibição do miR-155 após a isquemia experimental melhora a função vascular. Injeções intravenosas de um anti-miR-155 específico, iniciado em 48 horas após indução de isquemia cerebral pela oclusão da ACM, resultou em diminuição de 50% na regulação deste miRNA no hemisfério cerebral lesionado do rato.

Liu (2015), relata que o miR155 regula várias funções celulares e este poderia regular a via da expressão do gene da caspase-3, evidenciando que o seu silenciamento reduz o mecanismo de apoptose celular.

Em nosso estudo, na análise da expressão sérica do miR-155, foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos CxA, SxA e SxI+A.

Este trabalho permitiu comprovar a ativação do mecanismo de apoptose no cerebelo dos animais submetidos tanto à isquemia cerebral quanto ao alcoolismo crônico. Foi demonstrado que a expressão tecidual e sérica de marcadores relacionados ao mecanismo de apoptose avaliados nesse estudo puderam ser

observados mesmo distante do foco isquêmico. Isso comprova a grande suscetibilidade do tecido cerebelar ao insulto isquêmico, causando alterações na dinâmica global da homeostase no tecido encefálico.

Entretanto, mais estudos são necessários para entendermos o papel de outras proteínas anti e pró-apoptóticas.

8. CONCLUSÕES

Através deste estudo em ratos submetidos à isquemia cerebral focal por oclusão da ACM por 90 minutos, seguida por reperfusão de 48 horas, associado à modelo de alcoolismo crônico, concluímos que:

- Foi observada maior expressão da proteína Caspase-9 na camada granular do córtex cerebelar nos animais dos grupos I, A e I+A;
- Foi observada maior expressão da proteína Caspase-9 na camada molecular do córtex cerebelar nos animais dos grupos I, A e I+A;
- Foi observada maior expressão da proteína Caspase-9 nas células de Purkinje do córtex cerebelar nos animais dos grupos I, A e I+A;
- A expressão sérica do miRNA-21 foi maior nos animais dos grupos C e I;
- A expressão sérica do miRNA-126 foi maior nos animais dos grupos C, A e I+A, mas principalmente no grupo I;
- A expressão sérica do miRNA-155 foi maior nos animais dos grupos I e I+A, mas principalmente no grupo A.
- Os miRNAs 126 e 155 apresentam correlação com a apoptose celular em ratos isquêmicos e submetidos ao modelo de alcoolismo crônico.

9. REFERÊNCIAS

1. ADAMS, J. M. Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. *Genes and Development*, 2003.
2. AGUIAR, B. et al. MicroRNAs – Biogênese , funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. *Odontol. Clin.-Cient.*, v. 9, n. 2, p. 105–109, 2010.
3. ALBUQUERQUE, C. et al. Morphological and immunohistochemical analysis of apoptosis in the cerebellum of rats subjected to focal cerebral ischemia with or without alcoholism model 1. v. 31, n. 9, p. 629–637, 2016.
4. ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose : uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, v. 1, n. 1, p. 37–58, 2007.
5. ANTONIO, L.; DIAS, A.; COLLI, B. O. a V Aliação Da Isquemia Cerebral Cerebr Al Focal Induzida Pel a Ar Téria Cerebr Al Média E a Ação Neuroprotetora Neuroprotetor a Do Cetoprofeno Em R a Tos. v. 58, n. 4, p. 1047–1054, 2000.
6. AUMILLER V, FÖRSTEMANN K. Roles of microRNAs beyond development-metabolism and neural plasticity. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1779(11):692–696
7. BALA, S.; SZABO, G. MicroRNA Signature in Alcoholic Liver Disease. *International Journal of Hepatology*, v. 2012, p. 1–6, 2012.
8. BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281–297.
9. BAZOVKINA, D. V et al. [The Effects of Chronic Alcoholization on the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Receptors in the Brains of Mice Genetically Predisposed to Depressive-Like Behavior]. *Molekuliarnaia biologii*, v. 51, n. 4, p. 647–655, 2017.
10. BENNETT, E. R.; REUTER-RICE, K.; LASKOWITZ, D. T. Genetic Influences in Traumatic Brain Injury. v. 6, p. 1–32, 2016.
11. BIOAGENCY, Apoptose & inflamação. Disponível em: . Acesso em 10 nov. 2006.
12. BRASILEIRA, S. Primeiro Consenso Brasileiro Do Tratamento. *Neurology*, v. 59, n. 4, p. 972–980, 2001.
13. BRATINA ET AL. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine*, v. 333, n. 24, p. 1581–1588, 1995.

14. BULLER, B. et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death, *The FEBS Journal*, v.277, n. 20, p. 4299-4307, 2010.
15. CAMPOS, Vinicius Farias et al . MicroRNAs e seu papel no desenvolvimento embrionário. *Cienc. Rural*, Santa Maria , v. 41, n. 1, p. 85-93, 2011 .
16. CAMPOS-MOJENA, R. et al. Isquemia cerebral: mecanismos fisiopatológicos y oportunidades terapéuticas. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2016.
17. CAMPOS, W. K.; GUASTI, J. A. D. Infarto cerebral hemisférico : algoritmo de tratamento baseado em evidência. *Arq Bras Neurocir*, v. 30, n. 2, p. 76–83, 2011.
18. CANAZZA, A. et al. Experimental models of brain ischemia: A review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Frontiers in Neurology*, v. 5 FEB, n. February, p. 1–15, 2014.
19. CARDOSO AL, GUEDES JR, PEREIRA DE ALMEIDA L, PEDROSO DE LIMA MC. miR-155 modulates microglia-mediated immune response by down-regulating SOCS-1 and promoting cytokine and nitric oxide production. *Immunology*. 2012;135:73–88.
20. CARLOTTI, C. G.; COLLI, B. O.; KAZUO, J. Y. Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial: Modelo experimental. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 59, n. 2 B, p. 365–371, 2001.
21. CHO, Y. E. et al. Apoptosis of enterocytes and nitration of junctional complex proteins promote alcohol-induced gut leakiness and liver injury. *Journal of Hepatology*, v. 69, n. 1, p. 142–153, 2018.
22. DAMIANI, D. et al. Aspectos neurofuncionais do cerebelo: o fim de um dogma. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery*, v. 35, n. 01, p. 039–044, 2016.
23. DÂNGELO, JOSÉ GERALDO; FATTINI, C. A. *Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar*. 2. ed. [s.l: s.n.].
24. 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.
25. DHURIYA, Y. K.; SHARMA, D. Necroptosis: A regulated inflammatory

mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2018.

26. DIPPOLD, R. P. et al. Chronic Ethanol Feeding Alters miRNA Expression Dynamics During Liver Regeneration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 37, n. SUPPL.1, p. 59–69, 2013.

27. DONNAN, G. A. et al. Stroke. *Lancet*, v. 371, n. 9624, p. 1612–23, 2008.

28. ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

29. ENGELHARDT, E.; MOREIRA, D. M. O cerebelo e suas principais conexões: estudo com tensor de difusão. *Rev. bras. neurol*, v. 45, n. 3, p. 17–27, 2009.

30. FADDA, F. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, v. 56, n. 4, p. 385–431, 1998.

31. FILIPE, S.; POMBO, G. *As Tipologias Do Alcoolismo*: 2012.

32. GO, A. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: A report from the American Heart Association. [s.l.: s.n.]. v. 129

33. GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancrologia*, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

34. HAES, T. M. DE et al. Álcool E Sistema Nervoso Central. *Revista Brasileira de Neurologia*, v. 43, n. 2, p. 153–163, 2010.

35. HEISS, W. D.; HAYAKAWA, T.; WALTZ, A. G. Patterns of changes of blood flow and relationships to infarction in experimental cerebral ischemia. *Stroke*, v. 7, n. 5, p. 454–459, 1976.

36. HERTZ, L. Bioenergetics of cerebral ischemia: A cellular perspective. *Neuropharmacology*, v. 55, n. 3, p. 289–309, 2008.

37. J. F. R. KERR*, A. H. W. A. R. CURRIE. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Journal of Internal Medicine*, v. 258, n. 6, p. 479–517, 1972.

38. JONES, T. H. et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *Journal of Neurosurgery*, v. 54, n. 6, p. 773–782, 1981.

39. KANDA, T. et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, v. 24, n. 25, p. 2661–2672, 2018.

40. KIKKAWA Y, OGURA T, NAKAJIMA H, IKEDA T, TAKEDA R, NEKI H, KOHYAMA S, YAMANE F, KUROI R, AMANO T, NAKAMIZO A, MIZOGUCHI M, KURITA H. Altered Expression of MicroRNA-15a and Kruppel-Like Factor 4 in

Cerebrospinal Fluid and Plasma After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg.* 2017;108:909–916.e3

41. KONG F, ZHOU J, ZHOU W, GUO Y, LI G, YANG L. Protective role of microRNA-126 in intracerebral hemorrhage. *Mol Med Rep.* 2017;15(3):1419–1425.

42. LADEIRO, Y. et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*, v. 47, n. 6, p. 1955–1963, 2008.

43. LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. the C. elegans\rheterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense\rcomplementarity to lin-14. *Cell* , v. 75: 843–85, p. 843–854, 1993.

44. LIU, B. et al. Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus protects against cerebral ischemic injury by PPAR γ upregulation. *Neurological Research*, v. 39, n. 1, p. 23–29, 2017.

45. LORETO, C. et al. The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie's Disease. *Biomed Res Int*, v. 2014, p. 616149, 2014.

46. MANUEL, D.; PAULA, M. C e r e b e l o . p. 1–25, 2001.

47. MCDANIEL, K. et al. The functional role of microRNAs in alcoholic liver injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 18, n. 2, p. 197–207, 2014.

48. MON, A.; DURAZZO, T. C.; MEYERHOFF, D. J. Glutamate, GABA, and other cortical metabolite concentrations during early abstinence from alcohol and their associations with neurocognitive changes. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 125, n. 1–2, p. 27–36, 2012.

49. MOON, J. M.; XU, L.; GIFFARD, R. G. Inhibition of microRNA-181 reduces forebrain ischemia-induced neuronal loss *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2013.

50. NIJ,WANGX,CHENS,LIUH,WANGY,XUX,CHENGJ,JIAJ, ZHEN X. MicroRNA let-7c-5p protects against cerebral ische- mia injury via mechanisms involving the inhibition of micro- glia activation. *Brain Behav Immun.* 2015;49:75–85

51. OLIVEIRA, A. F. E Do Pré-Condicionamento Isquêmico 1 Basics Aspects of the Ischemia Reperfusion. v. 17, n. Suplemento 3, p. 96–100, 2002.

52. OLIVEIRA, S. A. et al. Apoptosis of Purkinje and Granular Cells of the Cerebellum Following Chronic Ethanol Intake. *Cerebellum*, v. 13, n. 6, p. 728–738, 2014.

53. PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation TL - 517. *Nature*, v. 517 VN-, n. 7534, p. 311–320, 2015.
54. 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* 2000; 35:35-43.
55. POUSA, D.; ABRAH, S. Expressão de AIF , PARP-1 e do microRNA-9 em modelo de isquemia cerebral experimental associada ao alcoolismo Expressão de AIF , PARP-1 e do microRNA-9 em modelo de isquemia cerebral experimental associada ao alcoolismo. 2016.
56. POWERS CJ, DICKERSON R, ZHANG SW, RINK C, ROY S, SEN CK. Human cerebrospinal fluid microRNA: temporal changes following subarachnoid hemorrhage. *Physiol Genomics*. 2016;48(5):361–366.
57. QI, Y. et al. MicroRNA-29b regulates ethanol-induced neuronal apoptosis in the developing cerebellum through SP1/RAX/PKR Cascade. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 14, p. 10201–10210, 2014.
58. QIN, Y. et al. Neuroprotective Effect of DAHP via Antiapoptosis in Cerebral Ischemia. v. 2018, 2018.
59. 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.
60. RATHMELL, J. C.; THOMPSON, C. B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, v. 109, n. 2 SUPPL. 1, p. 97–107, 2002.
61. REDELL JB, LIU Y, DASH PK. Traumatic brain injury alters expression of hippocampal microRNAs: potential regulators of multiple pathophysiological processes. *J Neurosci Res*. 2009;87(6):1435–1448.
62. SARDÁ, A. et al. Tendência da Mortalidade por Acidente Vascular Cerebral no Município de Maringá, Paraná entre os Anos de 2005 a 2015. *International Journal of Cardiovascular Sciences*, v. 31, n. 1, p. 56–62, 2018.
63. STYLLI SS, ADAMIDES AA, KOLDEJ RM, LUWOR RB, RITCHIE DS, ZIOGAS J, KAYE AH. miRNA expression profiling of cerebrospinal fluid in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2017;126(4):1131–1139.

64. TAN KS, ARMUGAM A, SEPRAMANIAM S, LIM KY, SETYOWATI KD, WANG CW, JEYASEELAN K. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. *PLoS One*. 2009;4(11):e7689.
65. TARANUKHIN, A. G. et al. Taurine protects cerebellar neurons of the external granular layer against ethanol-induced apoptosis in 7-day-old mice. *Amino Acids*, v. 43, n. 4, p. 1705–1711, 2012.
66. THAPALIA, B. A.; ZHOU, Z.; LIN, X. Autophagy, a process within reperfusion injury: An update. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 7, n. 12, p. 8322–8341, 2014.
67. THORNTON, C. et al. Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 11, n. August, p. 1–19, 2017.
68. TIRAPELLI, L. F. et al. Caspase-3 and Bcl-2 expression in glioblastoma: an immunohistochemical study. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, v. 68, n. December 2009, p. 603–607, 2010.
69. TIRAPELLI, L. F. et al. Apoptosis in Glioma Cells Treated with PDT. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 29, n. 5, p. 305–309, 2011.
70. WAHL, F. et al. Effect of riluzole on focal cerebral ischemia in rats. *European journal of pharmacology*, v. 230, n. 2, p. 209–14, 1993.
71. WANG, J. et al. Electrical Stimulation of Cerebellar Fastigial Nucleus: Mechanism of Neuroprotection and Prospects for Clinical Application against Cerebral Ischemia. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, v. 20, n. 8, p. 710–716, 2014.
72. WU, M. Y. et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 46, n. 4, p. 1650–1667, 2018.
73. XIAN, W.; WU, Y.; XIONG, W.; LI, L.; LI, T.; PAN, S.; SONG, L.; HU, L.; PEI, L.; YAO, S.; SHANG, Y. The pro-resolving lipid mediator Maresin 1 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating the pro-inflammatory response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 472, n. 1, p. 175-81, 2016.
74. XIE, Y.-L.; ZHANG, B.; JING, L. MiR-125b blocks Bax/Cytochrome C/Caspase-3 apoptotic signaling pathway in rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting p53. *Neurological Research*, v. 6412, p. 1–10, 2018.
75. XU, W. et al. The Roles of MicroRNAs in Stroke. *Cell Transplantation*, p.

096368971877336, 2018.

76. YI BR, KIM SU, CHOI KC. Development and application of neural stem cells for treating various human neurological diseases in animal models. *Lab Anim Res.* 2013;29(3):131–137

77. ZAGHLOUL, N. et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects against brain injury induced by chronic hypoxia. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. 1–11, 2014.

78. ZHANG, Y. et al. Cerebral endothelial cell apoptosis after ischemia-reperfusion: Role of PARP activation and AIF translocation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v. 25, n. 7, p. 868–877, 2005.

79. ZHANG, Y. et al. Xingnaojing Injection Protects against Cerebral Ischemia Reperfusion Injury via PI3K / Akt-Mediated eNOS Phosphorylation. v. 2018, 2018.

80. ZWERGAL, A. et al. Neurootologie: Grenzfälle zwischen Ohr und Gehirn. *Der Nervenarzt*, 2018.