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

DAYANA POUSA SIQUEIRA ABRAHÃO

**Expressão de AIF, PARP-1 e do microRNA-9 em modelo de
isquemia cerebral experimental associada ao alcoolismo**

RIBEIRÃO PRETO

2016

DAYANA POUSA SIQUEIRA ABRAHÃO

**Expressão de AIF, PARP-1 e do microRNA-9 em modelo de
isquemia cerebral experimental associada ao alcoolismo**

Tese de Doutorado apresentada a área de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, opção Medicina e Morfologia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Aluna: **Dayana Pousa Siqueira Abrahão**

Orientadora: **Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli.**

RIBEIRÃO PRETO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Abrahão, Dayana Pousa Siqueira

Expressão de AIF, PARP-1 e do microRNA-9 em modelo de isquemia cerebral experimental associada ao alcoolismo.

108 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia e Anatomia. Orientador: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli

1. Isquemia Cerebral, 2. Apoptose, 3. microRNA, 4. Alcoolismo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dayana Pousa Siqueira Abrahão

Expressão de AIF, PARP-1 e do microRNA-9 em modelo de isquemia cerebral experimental associada ao alcoolismo.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica – Opção: Morfologia e Medicina Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli.

Aprovado em :

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico,

Ao meu esposo Gustavo Silva Abrahão,

*Pela dedicação, paciência e eterno apoio e incentivo para minha formação
profissional e pessoal.*

Te amo!

AGRADECIMENTOS

A professora Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli pela orientação, oportunidade e confiança em que no pequeno tempo de convivência muito me ensinou para o meu crescimento pessoal, científico e intelectual.

Ao Eduardo Elias V. de Carvalho, colega de trabalho e de pós-graduação, pela grande contribuição no dia a dia da pós-graduação e especialmente pelo apoio e dedicação e amizade.

Ao Jairo Pinheiro, colega de pós-graduação, pelo constante apoio, incentivo e amizade.

Ao Fermino Sanches e Daniela Gattas, colegas de pós-graduação, pelo grande apoio e auxílio indispensáveis para a execução deste trabalho.

À Andressa Romualdo, pelos auxílios com a análise estatística.

Ao Dr. George Kemil Abdalla, colega de trabalho e também grande colaborador dessa conquista.

À Samantha Batista Amui, grande amiga, madrinha e afilhada, que também esteve ao meu lado em todos os momentos.

À professora Maria Heliodora do Vale Romeiro Collaço, pelas oportunidades, confiança e incentivo sem os quais a conquista de hoje não seria alcançada.

A todos valorosos colaboradores da FACTHUS, que estiveram presentes no dia a dia da construção dessa conquista.

À Faculdade de Talentos Humanos – FACTHUS, instituição que prezo como minha morada profissional e tenho a honra de fazer parte desde de 2006.

Aos meus pais que nunca me faltaram, ajudando a superar as dificuldades e norteando os meus caminhos, compartilhando das alegrias e tristezas, me provendo de forças para lutar pelos ideais almejados.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me auxiliaram na realização deste trabalho.

*Ninguém aprende a viver pela experiência alheia;
A vida seria ainda mais triste se, ao começarmos a viver,
já soubéssemos que viveríamos apenas para renovar a dor dos que viveram antes.*

(Jacinto Benavente y Martinez)

RESUMO

ABRAHÃO, D. P. S. **Expressão de AIF, PARP-1 e do microRNA-9 em modelo de isquemia cerebral experimental associada ao alcoolismo.** 2016. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Cirurgia e Anatomia. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2016.

Objetivo: Analisar e descrever o perfil de expressão das proteínas relacionadas ao mecanismo de apoptose (PARP e AIF), e o perfil de expressão gênica sérica do microRNA-9 relacionado ao mecanismo de apoptose, em ratos submetidos à isquemia cerebral focal por oclusão da ACM por 90 minutos, seguida de reperfusão de 48 horas, associado ou não com modelo de alcoolismo crônico. **Métodos:** Foram utilizados 20 ratos Wistar adultos, subdivididos em 4 grupos experimentais: grupo controle (C): animais submetidos apenas à anestesia; 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 encéfalo coletadas foram processadas para a análise imunohistoquímica (para a expressão proteica de PARP-1 e AIF); e o sangue da artéria ventral da cauda foi coletado para a análise da expressão gênica do miRNA-9, relacionada ao mecanismo de apoptose, pela técnica de PCR em tempo real. **Resultados:** A comparação entre os grupos identificou uma redução da expressão proteica de PARP-1 nos animais do grupo AI quando comparado com os demais. Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína AIF somente no grupo IA. Não houve diferença estatisticamente significativa da expressão sérica do miRNA-9 entre os grupos. **Conclusão:** O modelo proposto, pode não ter sido suficiente para promover a ativação de AIF nos grupos C, A e I e desta forma, a apoptose celular por essa via analisada. A expressão proteica de PARP-1 no grupo A, associado com a expressão nula de AIF, indica um efeito neuroprotetor do etanol neste grupo. A redução da expressão proteica de PARP-1 não afetou sua atividade enzimática, proporcionando, mesmo em baixas concentrações, ativação de AIF no grupo IA. A expressão de PARP-1 no grupo I, associada a expressão nula de AIF indica que o modelo de isquemia possivelmente gerou leves danos no DNA o que estimulou a ativação de PARP-1 somente em níveis suficientes para promover a reparação do DNA e não a ativação do processo de apoptose pela translocação de AIF. A expressão gênica sérica do miRNA-9 observada indicou que a mesma foi suprimida quando exposta a mecanismos de estresse (alcoolismo, isquemia e a associação dos mesmos). A correlação do miRNA-9 com a expressão proteica de PARP-1 e AIF, indicou um aspecto protetor da baixa regulação do miRNA-9 tanto em animais alcoolizados como em animais isquêmicos. O grupo IA apresentou uma tendência a baixa expressão do miRNA-9, baixa expressão de PARP-1 e alta expressão de AIF, indicando que a associação álcool e isquemia tenha interferido no efeito protetor do miRNA-9 visto nos demais grupos.

Descritores: Isquemia cerebral, apoptose, microRNA, alcoolismo

ABSTRACT

ABRAHÃO, D. P. S. **Expression of AIF, PARP-1 and microRNA-9 in experimental model of cerebral ischemia associated to alcoholism.** 2016. Thesis (Doctorate in Medical Science) – Medicine School of Ribeirão Preto, Department of surgery and Anatomy University of São Paulo, Ribeirão Preto. 2016.

Aim: To analyze and describe the expression profile of proteins related to apoptosis mechanism (PARP and AIF), and profile of gene expression of miRNA-9 related to apoptosis mechanism in rats submitted to focal cerebral ischemia by occlusion of the CMA for 90 minutes, followed by 48 hours of reperfusion, associated or without associated to chronic alcoholism model. **Methods:** 20 adult Wistar rats were used, divided into 4 groups: control group (C): animals submitted only to anesthesia; Ischemic group (I): animals subjected to focal cerebral ischemia for 90 minutes followed by 48 hours of reperfusion; alcoholic group (A): animals that received daily solution of 20% of absolute ethyl alcohol diluted in water during four weeks; and ischemic group and alcoholized (IA): Animals subjected to the same treatment group A and after four weeks were subjected to focal cerebral ischemia for 90 minutes followed by 48 hours of reperfusion. The brain samples were collected and processed for immunohistochemical analysis (for protein expression - PARP-1 and AIF); and the blood from ventral artery of tail was collected for the analysis, by PCR in real time, of gene expression of miRNA-9 related to the mechanism of apoptosis. **Results:** The comparison between the groups identified a decrease in protein expression (PARP-1) in animals from IA group compared to others groups. Nuclear positive staining was observed for the AIF protein only in the IA group. There was no significant difference in serum expression of miRNA-9 between the groups. **Conclusion:** The proposed model may not have been sufficient to promote the activation of AIF in groups C, A and I, and thus the apoptosis analyzed in this way. Protein expression of PARP-1 in group A associated with a null expression of AIF, indicate a neuroprotective effect of ethanol in this group. The reduction of protein expression PARP-1 did not affect its enzymatic activity, providing even at low concentrations, activation AIF in IA group. The expression of PARP-1 in group I associated with null expression of AIF showed that model of ischemia, possibly, promoted light damage in DNA which stimulated PARP-1 activation just in sufficient levels to promote DNA repair, and without activation of apoptosis by translocation of AIF. The gene expression of miRNA-9 indicated that it was suppressed when exposed to mechanical stress (alcoholism, ischemia and combination thereof). The correlation of miRNA-9 with the protein expression (PARP-1 and AIF), indicated a protective aspect of downregulation of the miRNA-9 in both animals drunk as ischemic animals. IA group showed a trend to low expression of miRNA-9 and PARP-1, in other hand an overexpression of AIF, indicating that the association between alcohol and ischemia interfered in protective effect of miRNA-9 seen in the other groups.

Descriptors: cerebral ischemia, apoptosis, microRNA, alcoholism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação da PARP-1 e o papel do PAR em parthanatos.....	27
Figura 2 - Animal fixado à prancha de madeira e intubado com cânula orotraqueal.....	35
Figura 3 - Respirador desenvolvido para animais de pequeno porte (CR-BION – Ribeirão Preto, Brasil). Cânula orotraqueal (→).....	35
Figura 4 - Detalhe da artéria ventral da cauda do rato após canulação.....	36
Figura 5 – Desenho (A) e foto (B) ilustrando a incisão mediana na região ventral e cervical do rato com afastamento lateral da pele com 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 esternohióideo (EH); músculo esternomastóideo (EM); músculo masséter (M); músculo omohióideo (OH); músculo trapézioclavicular (TC).....	37
Figura 6 - Fotografia mostrando afastamento da musculatura cervical superficial no antímero esquerdo com exposição da bainha carótida (→).....	38
Figura 7 - (A) Desenho e (B) fotografia representando a exposição das artérias carótidas comum esquerda (CCE), carótida interna esquerda (CIE) e carótida externa esquerda (CEE) com alguns dos seus ramos cervicais (*), após afastamento da musculatura cervical superficial.....	39
Figura 8 - Desenho (A) e fotografia (B) ilustrando os ramos colaterais da ACE (setas) coagulados, após dissecação das artérias CCE, CIE e do seu ramo cervical, a PPE (apenas em A).....	40
Figura 9 - Fio obstrutor, extensão de 2,5 cm e extremidade espessada com silicone (→).....	41
Figura 10 – Desenho (A) e fotografia (B) ilustrando a clampagem da porção inicial da ACI (seta).....	42
Figura 11 - Fotografia ilustrando a ligadura da porção proximal da ACEE (seta), a clampagem da ACCE e da APPE.....	42
Figura 12 – Desenho (A) e fotografia (B) ilustrando a ligadura da porção proximal da ACEE (seta), a clampagem da ACCE (A), ACIE (B) e APPE (C) e a secção proximal da artéria carótida externa esquerda (*).	43
Figura 13 - Desenho ilustrando a posição correta da ACEE (seta) para a introdução do fio obstrutor. Novamente: clampagem da ACCE (A), ACIE (B) e APPE (C).....	43

Figura 14 – A: Fotografia ilustrando o local da secção da ACE. B: Fotografia ilustrando 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.....	44
Figura 15 - Desenho ilustrando a introdução do fio obstrutor (seta) no interior da ACEE em direção à ACCE e ACIE (A), após a retirada dos microclipes da ACIE e APPE.	45
Figura 16 - Fotografia com detalhe da posição do fio obstrutor (seta) no interior da ACEE em direção à ACCE e ACIE, com permanência do microclipe na ACCE.	45
Figura 17 - A. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME (M) (no detalhe superior direito) e a ligadura da ACEE na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). Por fim, a reperfusão da ACCE (C) é permitida após a retirada do seu microclipe. Artéria carótida interna esquerda (I); artéria cerebral anterior esquerda (A); artéria pterigopalatina esquerda (P).	46
Figura 18 - Fotografia final do procedimento cirúrgico com a introdução completa do fio obstrutor (seta).	47
Figura 19 - A. Retirada da pele para incisão cervical (B).	48
Figura 20 - Corte interorbital.....	49
Figura 21 - Exposição do encéfalo.	49
Figura 22 - Encéfalo isolado.....	50
Figura 23 - Molde de aço (Matrix – ASI – Instruments – CBM – 2000C U.S.A.).	50
Figura 24 - A. Visão ventral do encéfalo isolado colocado sobre molde de aço. B. Posição da gilete ao nível do corte coronal para coleta.	51
Figura 25 - Corte coronal do encéfalo obtido a partir do molde de aço. Corpo caloso (setas).	52
Figura 26 - Corte sagital mediano com visão das principais estruturas observadas no encéfalo de rato adulto. As linhas A – anterior ou rostral (em azul) e B – posterior (em vermelho), indicam os dois níveis de cortes coronais utilizados para avaliação pela IH. Aqueduto cerebral (AC); bulbo olfatório (BO); comissura anterior (CA); corpo caloso (CC); cerebelo (CE); cíngulo (CG); hipocampo (H); glândula pineal (P); ponte (PO); quiasma óptico (QO); tálamo (TA); teto mesencefálico (TE); terceiro ventrículo (III); quarto ventrículo (IV).	52
Figura 27 - Desenhos dos cortes coronais do encéfalo nas regiões avaliadas, mostrando à esquerda a ACM e alguns dos seus ramos e à direita, as três áreas avaliadas neste estudo: córtex dorsolateral (1); córtex lateral (2), e striatum (3). A. Corte coronal anterior ou rostral. Artéria cerebral média (ACM) originando várias pequenas artérias subcorticais perfurantes ou centrais (*); artéria estriada anterior (AEA) – ramo da ACM. Comissura anterior (CA); ventrículo lateral (VL). B. Corte coronal posterior com ACM emitindo a artéria estriada posterior (AEP). Corpo caloso (CC). Cápsula externa (CE); cápsula interna (CI); terceiro ventrículo (III).	53

Figura 28 - Corte coronal do encéfalo mostrando os campos medial (M) e lateral (L) demarcados para as três áreas de avaliação no estudo IH: área 1 – córtex dorsolateral (em verde); área 2 – córtex lateral (em vermelho); e, área 3 - striatum (em azul).	56
Figura 29 - Striatum do rato 1 do grupo AI após contagem das células positivas à AIF (pontos vermelhos) e células negativas (pontos azuis) em campo com aumento de 400x.....	57
Figura 30 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de PARP-1 na área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CDL) nos grupos analisados (p=0,0014 teste Kruskal-Wallis). Grupo C versus AI (p=0,0079**); grupo A versus AI (p=0,0119*), pós teste de Dunns.	62
Figura 31 - Fotomicrografia do córtex dorsolateral (CDL) da imunohistoquímica de PARP-1. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para PARP-1 estão identificadas pelas setas. Observa-se menor marcação positiva no grupo AI. 400x.	63
Figura 32 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de PARP-1 na área 1 e 2 do córtex lateral (CL) nos grupos analisados (p=0,0045 teste Kruskal-Wallis). Grupo C versus AI (p=0,0159*); grupo A versus AI (p=0,0079*), pós teste de Dunns.	64
Figura 33 - Fotomicrografia do córtex lateral (CL) da imunohistoquímica de PARP-1. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para PARP-1 estão identificadas pelas setas. Observa-se menor marcação positiva no grupo AI. 400x.	65
Figura 34 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de PARP-1 na área 1 e 2 do striatum (S) nos grupos analisados (p=0,0042 teste Kruskal-Wallis). Grupo C versus AI (p=0,0079**); grupo A versus AI (p=0,0079**), pós teste de Dunns.	66
Figura 35 - Fotomicrografia do striatum (S) da imunohistoquímica de PARP-1. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para PARP-1 estão identificadas pelas setas. Observa-se menor marcação positiva no grupo AI. 400x.	67
Figura 36 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de AIF na área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CDL) nos grupos analisados (p=0,0003 teste Kruskal-Wallis).	68
Figura 37 - Fotomicrografia do córtex dorsolateral (CDL) da imunohistoquímica de AIF. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para AIF estão identificadas pela seta. Observa-se marcação positiva somente no grupo AI. 400x.	69
Figura 38 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de AIF na área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CL) nos grupos analisados (p=0,0187 teste Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos.	70

Figura 39 - Fotomicrografia do córtex lateral (CL) da imunohistoquímica de AIF. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para AIF estão identificadas pela seta. Observa-se marcação positiva somente no grupo AI. 400x71

Figura 40 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de AIF na área 1 e 2 do striatum (S) nos grupos analisados ($p=0,0187$ teste Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos.72

Figura 41 - Fotomicrografia striatum (S) da imunohistoquímica de AIF. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo IA. As células marcadas positivamente para AIF estão identificadas pela seta. Observa-se marcação positiva somente no grupo IA. 400x73

Figura 42 - Representação da média e desvio padrão da expressão gênica sérica do miRNA-9 entre os grupos estudados.74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O Acidente Vascular Encefálico (AVE).....	18
1.2 Efeitos do álcool sobre o Sistema Cardiovascular e o AVE	21
1.3 Apoptose	23
1.3.1 Vias de apoptose independente de Caspases (PARP e AIF).....	25
1.4 O micro-RNA-9.....	28
2 OBJETIVO	31
3 MÉTODOS	33
3.1 Animais.....	33
3.2 Grupos experimentais	33
3.3 Protocolo de alcoolização.....	34
3.4 Preparação do animal para o procedimento cirúrgico	34
3.5 Procedimento cirúrgico para a realização da isquemia seguida de reperfusão...	37
3.6 Retirada do encéfalo	48
3.7. Avaliação da isquemia cerebral experimental	53
3.7.1. Análise das amostras	53
3.7.1.1. Análise imunohistoquímica	53
3.7.1.2 Análise da expressão gênica sérica do microRNA-9.....	57
3.8 Análise estatística	59
4 RESULTADOS.....	62
4.1 Análise imunohistoquímica de PARP-1	62
4.1.1 Área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CDL).....	62
4.1.2 Área 1 e 2 do córtex lateral (CL)	64
4.1.3 Área 1 e 2 do striatum (S)	66
4.2 Análise imunohistoquímica de AIF	68
4.2.1 Área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CDL).....	68
4.2.2 Área 1 e 2 do córtex lateral (CL)	70
4.2.3 Área 1 e 2 do Striatum (S).....	72
4.3 Análise da expressão gênica sérica do miRNA-9.....	74
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	89

Introdução

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as doenças cardiovasculares (DCV) representam aproximadamente 30% de todos os óbitos registrados, sendo que cerca de 50% dos indivíduos acometidos são adultos entre 30 e 69 anos, em plena fase produtiva (BRASIL, 2006). A mortalidade prematura em adultos e as incapacidades resultantes, parciais ou totais, têm importantes repercussões na qualidade de vida e na rede social dos pacientes, além do grande impacto nos sistemas de saúde (PEREIRA; BARRETO; PASSOS, 2009).

Apesar da gravidade das DCV e do aumento de sua incidência com o avanço da idade, grande parte dessas doenças poderia ser evitada. Assim como as doenças crônicas não transmissíveis mais frequentes, as DCV, o diabetes e o câncer, compartilham vários fatores de risco. A Organização Mundial da Saúde (OMS) propõe uma abordagem de prevenção e controle integrados, em todas as idades, baseada na redução dos seguintes fatores: hipertensão arterial, tabagismo, uso abusivo de bebida alcoólica, inatividade física, dieta inadequada, obesidade e hipercolesterolemia (WHO, 2002).

O uso livre de bebidas alcoólicas é um comportamento presente e admitido em diversas culturas, sociedades e na história humana, havendo, de forma geral, um conteúdo ritualístico em tal comportamento. Porém, com a modernização e a mudança da organização social em algumas culturas e com as transformações econômicas e sociais, houve também uma mudança na forma como os indivíduos e grupos passaram a utilizar estas bebidas. Esse comportamento tem sido associado principalmente ao contexto recreativo ou à busca imediata de prazer, com padrões de uso em grandes quantidades em uma única ocasião ou ao longo do tempo, característica que coloca o consumo destas bebidas e seus já bem conhecidos efeitos deletérios para o corpo humano, atualmente como um dos principais problemas de saúde pública no mundo (GIGLIOTTI; BESSA, 2004; MELONI; LARANJEIRA, 2004; ROZANI, 2005)

É cada vez mais evidente a complexidade envolvida no consumo de bebidas alcoólicas, sendo fundamentais abordagem e entendimento ampliados sobre o tema (BABOR, 2002). Além disso, dentro da atual realidade epidemiológica do Brasil e do mundo, com o aumento constatado da incidência de doenças crônicas, os aspectos

comportamentais envolvidos no tratamento e na prevenção da maioria das doenças apresentam importância cada vez maior. As atitudes que a população ou profissionais apresentam sobre determinada situação de saúde são fundamentais para a qualidade do atendimento, adesão ao tratamento e atividades de prevenção (BERGER; WAGNER; BAKER, 2005; FORTNEY *et al.*, 2005).

O uso de substâncias psicoativas, sobretudo de bebidas com teor alcoólico, encontra-se presente em anúncios comerciais, filmes, letras de música e outros meios de comunicação de massa. A apresentação dessas substâncias associadas a fatores desejáveis como prazer, beleza, sucesso financeiro e sexual, poder e outros, de forma explícita ou implícita, configura-se um importante fator de risco para o seu consumo abusivo (ZASLOW; TAKANISHI, 1993). Além disso, o consumo de bebidas alcoólicas pode estar associado ao consumo de tabaco e ao comportamento sexual de risco, os quais são alguns dos principais fatores relacionados com o estado de saúde dos indivíduos e das populações (PEDROSA *et al.*, 2011)

O consumo de bebidas alcoólicas como acompanhamento da alimentação e de celebrações tem sido observado em diferentes civilizações e culturas na história da humanidade. O grande papel que a produção e o consumo de bebidas alcoólicas desempenham na vida social e econômica das sociedades ocidentais não deve permitir que se menospreze o fato de que o problema do alcoolismo é muito maior do que todas as outras formas combinadas do abuso de substâncias (PADUANI *et al.*, 2008).

Em vários estudos realizados em diferentes países, verifica-se em parcela significativa da população, a ocorrência de padrões de consumo de bebida alcoólica com elevado grau de risco para diversos problemas de saúde, psicológicos e sociais (MELONI; LARANJEIRA, 2004; BABOR; HIGGINS-BIDDLE, 2003, WHO, 2001). Estima-se que dois terços da população adulta consomem álcool em algum grau e mais de 10% fazem uso abusivo (SKOTZKO *et al.*, 2009). Tais dados refletem no aumento de 1,5% das taxas de morbidade e mortalidade atribuíveis ao uso abusivo de bebida alcoólica em 1990 para 3,2% em 2000, havendo um aumento de mais que o dobro no valor encontrado no período de dez anos, indicando, portanto, uma tendência preocupante em termos de saúde pública.

A ingestão exagerada de bebida alcoólica é responsável por 3,2% das mortes e 4,0% de AVAIs (anos de vida ajustados por incapacidade ou *DALYs*) (WHO, 2001). Na América Latina, isto se torna um problema mais evidente, sendo a principal causa de carga global de doenças em população acima de 15 anos (WHO,

1999). Estima-se um consumo médio *per capita* de 6,7 litros de álcool puro por ano, com tendência de aumento de consumo ao longo dos anos (WHO, 1999).

No Brasil, estima-se que 12,3% da população geral sejam dependentes de álcool, com prevalência crescente ao longo dos anos, segundo estudo do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (Cebid) (CARLINI; GALDURÓZ, 2007), sendo a prevalência de 17,1% entre a população masculina e 5,7% na população feminina (CARLINI *et al.*, 2005).

Além da dependência em si, algumas informações epidemiológicas sobre o uso crônico de bebida alcoólica sugerem que esse comportamento não se limita a esse problema, mas a outros como violência, agravos crônicos e agudos de saúde associados, acidentes de trânsito etc. (LARANJEIRA *et al.*, 2007; GALDURÓZ *et al.*, 2005), havendo início de uso cada vez mais cedo entre os jovens (RITSHER; PHELAN, 2004) e consumo cada vez maior entre as mulheres (GALDURÓZ *et al.*, 2005).

Além disso, as taxas de consumo excessivo de álcool entre os jovens, incluindo estudantes universitários, é preocupante (TIMOTHY; DAVID; ROBERT, 2010). O uso excessivo de álcool é a terceira causa de morte relacionados com estilo de vida nos EUA a cada ano, atrás somente do tabaco, dieta inadequada/sedentarismo, que são classificados em primeira e segunda causa de morte respectivamente (MORKDAD *et al.*, 2000).

1.1 O Acidente Vascular Encefálico (AVE)

O Acidente Vascular Encefálico (AVE), de acordo com a Organização Mundial de Saúde, ocorre de início agudo a partir de uma anormalidade neurológica focal (ou global, como na hemorragia subaracnóide) secundário a uma hemorragia ou mais comumente a uma interrupção do fornecimento de sangue a uma área cerebral, que tenha duração de mais de 24 horas e que leva à morte, sem causa aparente que não seja de origem vascular (WARLOW *et al.*, 2001 apud WARLOW *et al.*, 2003; RECKELESS; BUCHAN, 2008). Cerca de 85-90% dos acidentes vasculares cerebrais são isquêmicos (resultante da oclusão arterial), e 10-15% resultado de hemorragia intracerebral primária e por volta de 5% devido a hemorragia subaracnóide (WARLOW *et al.*, 2001 apud WARLOW *et al.*, 2003; MUIR, 2008).

A isquemia cerebral focal ocorre quando uma região limitada do sistema nervoso central tem seu fluxo diminuído a níveis que comprometem a integridade celular, podendo levar à necrose, à apoptose ou a ambas (SELMAN; LUST; PUNDIK, 1992).

A região isquêmica cerebral pode ser dividida numa zona em que o fluxo de sangue é completamente ausente (núcleo isquêmico) e uma zona periférica, em que os vasos colaterais fornecem apenas uma fração do oxigênio e glicose necessários para a atividade normal das células neurais (penumbra isquêmica) (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; ASTRUP; SIESJÖ; SYMON, 1981). Enquanto todos os tipos de células na região do núcleo se submetem às características típicas necróticas e morrem formando uma zona de infarto, a área de penumbra pode inicialmente manter a sua integridade morfológica, mesmo que as suas funções (ou seja, a atividade elétrica, os processos sintéticos, funções bioenergéticas, etc) estejam temporariamente perdidas. Por outro lado, tal área é passível de salvamento quando estratégias de neuroproteção são adotadas, ao contrário da zona isquêmica central (DEZENA, 2011). Neuroproteção é uma estratégia para que se restabeleça o microambiente e as condições necessárias para que os neurônios danificados do cérebro possam inibir processos intrínsecos indesejáveis de morte celular programada. Redução de metabolismo celular e estimulação de propriedades tróficas nestas células é propício para a realização de um novo equilíbrio para a viabilidade celular. Para este fim, muitos tipos de intervenções físicas e farmacológicas têm sido empregados em unidades de terapia intensiva (FEIGIN; FINDLAY, 2006).

No entanto, se um fluxo de sangue suficiente, eventualmente, retorna para a região isquêmica dentro de um tempo razoável (horas), é possível resgatar esta área, limitando, assim, o dano neurológico. É claro que, a fim de proceder à plena recuperação funcional, não apenas os neurônios, mas todos os tipos de células (ou seja, os astrócitos, micróglia, oligodendrócitos, células endoteliais, células musculares, pericitos) e estruturas (principalmente membranas basais) presentes na “área de penumbra” devem ser resgatadas (IADECOLA et al., 2006; DEL ZOPPO; MABUCHI, 2003). O AVE afeta mais frequentemente a região da artéria cerebral média (ACM) (BOGOUSSLAWSKY; MELLE; REGLI, 1988) e é uma das mais sérias doenças cerebrovasculares, levando a morbidade e mortalidade significativas em todo o mundo (DONNAN et al., 2008; MANDEL et al., 2012).

O AVE é a causa de 9% de todas as mortes em todo o mundo e é a segunda causa mais comum de morte após a doença isquêmica do coração. Dois terços das

mortes ocorrem em países menos desenvolvidos (MURRAY, LOPES, 1996 apud WARLOW et al., 2003; MURRAY, LOPEZ, 1997b). O AVE também causou 3% dos casos de incapacidade no mundo 1990. Em 2002, a incapacidade relacionada ao AVE foi considerada a sexta maior causa de redução de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs- a soma de anos de vida perdidos como resultado de morte prematura e anos vividos com incapacidade ajustada por gravidade) (MURRAY; LOPEZ, 1997a). Em 2020, a expectativa é que a mortalidade seja duplicada, principalmente como resultado de um aumento na proporção de pessoas idosas e os efeitos futuros dos padrões atuais de tabagismo em países menos desenvolvidos. Devido ao aumento da população de idosos nas sociedades ocidentais, a estimativa é que até 2030 a incapacidade relacionada ao acidente vascular encefálico seja considerada como a quarta causa mais importante de DALYs (LOPEZ et al., 2006).

Essa transição epidemiológica observada na América Latina que caminha para o aumento do número de pessoas idosas e também para o aumento da urbanização, leva a um aumento dos fatores de risco cardiovasculares e um aumento nas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas tanto ao AVE quanto para o infarto agudo do miocárdio (ÔUNPUU; ANAND; YUSUF, 2000). No entanto, o acidente vascular encefálico apresenta muito menos financiamento para pesquisa do que a doença cardíaca ou o câncer (ROTHWELL, 2001).

Apesar dos avançados procedimentos intravasculares, o tratamento mais usado atualmente para AVE isquêmico é a administração de drogas, incluindo agentes trombolíticos, ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rtPA) e antagonistas de íons de cálcio (GINSBERG, 2008). No entanto, o curto período de tempo para o uso da medicação, assim como os seus frequentes efeitos colaterais, parecem ser uma restrição de sua eficácia clínica, especialmente para uso a longo prazo (GOLDSTEIN; ROTHWELL, 2008).

Infelizmente, as opções de tratamento para o AVE são limitadas (GOLDSTEIN; ROTHWELL, 2008). Desde a aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA em 1996, a administração intravenosa de rtPA, que dissolve o coágulo obstrutivo para restaurar o fluxo de sangue (HACKE et al., 2008), continua a ser o único tratamento para pacientes dentro de 4,5 horas de início do AVE. No entanto, apenas uma pequena porcentagem de pacientes com AVE isquêmico são elegíveis para tratamento com rtPA, devido à sua margem terapêutica

estreita e o risco de hemorragia cerebral (ADEOYE et al., 2011; KLEINDORFER et al., 2008; FONAROW et al., 2011).

O tratamento eficaz do acidente vascular cerebral requer recanalização dos vasos sanguíneos cerebrais obstruídos. No entanto, a reperfusão após isquemia cerebral pode causar lesões cerebrais, conduzindo a formação de edema cerebral, hemorragia e morte neuronal por apoptose /necrose. Estas complicações, juntamente com a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) em mitocôndrias, limitam significativamente os benefícios do tratamento de acidente vascular cerebral (JUNG et al., 2010)

Há poucos relatos que descrevem a relação entre fatores de risco cardiovasculares e acidente vascular cerebral na América Latina. Na Argentina, dois registros hospitalares forneceram dados sobre a maioria dos fatores de risco cardiovasculares prevalentes em pacientes com AVE. Incluindo 84 centros em todo o país e dados de 1.235 pacientes, os investigadores descobriram que o importante fator de risco foi a hipertensão arterial (78,5%) seguido pela história de doença cardíaca (34%), tabagismo (32%), dislipidemia (31%), acidente vascular cerebral anterior (22%), diabetes mellitus (17%), e fibrilação atrial (15%) (ATALLAH; FUSTINONI; BEIGELMAN, 2004). O segundo registro epidemiológico envolvendo 1.991 pacientes com acidente vascular cerebral em 74 hospitais públicos e privados; 83% eram eventos isquêmicos e hemorrágicos 17%; e o grande risco fator também foi hipertensão arterial (81,6%) (SPOSATO et al., 2008).

A hipertensão arterial é o maior fator de risco para o acidente vascular cerebral. Tem sido relatado que reduções moderadas na pressão arterial durante a primeira semana após a admissão hospitalar estão associadas à melhora funcional a curto prazo em pacientes que sofreram acidente vascular cerebral isquêmico agudo. Portanto, fármacos anti-hipertensivo têm sido utilizados para tratar pacientes com AVE (RODRIGUEZ-GARCIA et al., 2005).

1.2 Efeitos do álcool sobre o Sistema Cardiovascular e o AVE

O consumo de bebidas alcoólicas é um fator de risco para acidente vascular cerebral e doenças cardiovascular (O'KEEFE et al., 2014). A etiologia do AVE não é

claramente conhecida, mas além do álcool, diabetes, tabagismo, hiperlipidemia, hipertensão e outros são também documentados como fatores de risco (PAPAPOSTOLOU et al., 2014).

O elevado consumo de álcool e o alcoolismo crônico são fortes fatores de risco independentes para o AVE (KLATSKY et al., 2001). Mesmo assim, a maioria dos estudos revelam uma associação em forma de “J” entre álcool e acidente vascular cerebral isquêmico, com um efeito protetor relacionado ao consumo moderado de álcool e um risco elevado de acidente vascular cerebral com o consumo elevado (SACCO et al., 1999; BERGER et al., 1999; ISO et al., 2004).

Vários estudos demonstram que o efeito de etanol sobre o sistema cardiovascular é dose-dependente: o consumo regular e moderado tem efeitos benéficos, reduz a mortalidade global e cardiovascular até quando comparado com os abstêmios, enquanto que o consumo excessivo está associado a efeitos prejudiciais sobre o sistema cardiovascular, tais como cardiomiopatia alcóolica (CMA), hiperlipidemia, vasoconstrição, hipertensão arterial e um menor limiar para fibrilação atrial e pode conduzir à disfunção cardíaca progressiva e insuficiência cardíaca (COSTANZO *et al.*, 2010; DI CASTELNUOVO *et al.*, 2006; MUKAMAL, 2003; MOVVA; FIGUEREDO, 2013; BRYSON *et al.*, 2006).

Em um estudo recente com mais de 1 milhão de pessoas constatou-se que o consumo de uma dose de bebida diariamente por mulheres e uma ou duas doses por dia por homens foi associado com uma redução na mortalidade total de 18%. Por outro lado, a ingestão de bebidas diárias maior que 2 doses em mulheres e maior que 3 doses em homens foram associadas com um aumento da mortalidade de uma forma dose-dependente (DI CASTELNUOVO *et al.*, 2006).

O efeito protetor do consumo de álcool está relacionado predominantemente ao aumento da sensibilidade à insulina e elevação de HDL (lipoproteína de alta densidade) dependente da dose (MUKAMAL et al., 2005; FREIBERG; SAMET, 2005; MUKAMAL et al., 2003).

Estudos recentes demonstraram que não só a quantidade, mas também padrões de consumo e fatores genéticos podem influenciar a relação entre consumo de bebida alcoólica e doença cardiovascular (IRMA *et al.*, 2009).

1.3 Apoptose

O acidente vascular cerebral isquêmico é responsável por uma grande proporção de doença clínica cerebrovascular. Seu principal processo fisiopatológico é a lesão cerebral isquemia/reperfusão (I/R), com a apoptose sendo a chave da patologia da doença (HAUK et al., 2002; ABAS et al., 2010; WANG et al., 2014).

A apoptose após lesão cerebral de I/R é uma das vias principais que conduzem ao processo de morte celular (MATTSON, DUAN, PEDERSEN, 2001). A revascularização dos vasos obstruídos permitindo reperfusão oportuna é uma das estratégias que atualmente vem sendo utilizadas no AVC agudo. No entanto, o processo de isquemia e de reperfusão desencadeiam diferentes eventos fisiopatológicos, entre eles redução da produção de adenosina trifosfato, perda da homeostase da bomba de íons, o aumento de cálcio intracelular, a formação de radicais livres, resposta inflamatória, a ativação de leucócitos, a despolarização da membrana com uma libertação excessiva dos aminoácidos excitatórios, tais como glutamato e dopamina. Este processo desencadeia ainda a lesão de reperfusão, que é um processo complexo que envolve disfunção endotelial e microvascular, fluxo sanguíneo prejudicado, disfunção metabólica, necrose celular e apoptose (HACHIMI-IDRISSI et al., 2004; ZHAO; SAPOLSKY; STEINBERG, 2006).

A apoptose, ou morte celular programada, é um programa genético de regulação da homeostase que foi identificado pela primeira vez no nematódeo *C. elegans* (HENGARTNER; ELLIS; HORVITZ, 1992). A morte celular apoptótica é um mecanismo universal para organismos multicelulares para regular o crescimento adequado durante o desenvolvimento, homeostasia tecidual, e estresse tóxico através da eliminação de células (HARBOUR; DEAN, 2000).

A morte celular é crítica para a manutenção da homeostasia em organismos multicelulares; em excesso pode resultar em patologias, tais como a neurodegeneração, ao passo que em pouca quantidade podem conduzir ao acúmulo de células cancerosas malignas. A morte celular pode ser tanto ativa, em que a célula participa na sua própria destruição, ou passiva, por exemplo, quando uma célula sofre danos físicos irreparáveis (GREEN; VICTOR, 2012).

A forma de morte celular mais bioquimicamente caracterizada é a apoptose, um processo ativo no qual proteases cisteína (caspases) são ativados em resposta a

estímulos extracelulares ou danos internos, culminando em uma forma de morte celular definida por eventos moleculares distintos e mudanças características na morfologia da célula que está a morrer. Recentemente, um número de mecanismos não apoptóticos de morte celular regulados ativamente surgiram, incluindo necroptose, piroptose e ferroptose (BERGHE et al., 2014; TAIT; ICHIM; GREEN, 2014).

O conceito de "morte celular programada" foi concebido há mais de um século, em 1964, quando Lockshin e Williams descreveu a morte celular regulada durante a metamorfose do inseto (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964). Schweichel e Merker foram subsequentemente os primeiros a relataram a presença de três tipos distintos de morte celular em embriões de ratos, após a exposição a toxinas, que também ocorrem com frequência muito baixa no rato em desenvolvimento: Tipo I de morte celular que foi associado com heterofagia ('comer outro'); Tipo II de morte celular foi associada a autofagia ('comer de si'); e tipo III morte celular não envolvem a digestão (SCHWEICHEL; MERKER, 1973). Hoje, esses mecanismos de morte celular são referidos como a apoptose, morte celular associada com autofagia e necrose, respectivamente (ELLIS; HORVITZ, 1986).

Esses mecanismos de morte celular são considerados ativos, ou seja, a célula participa ativamente de sua morte, essencialmente um suicídio. Há também o modo de morte celular passivo, onde a célula apresenta uma lesão irreparável, uma função vital que foi danificada ou diretamente inibida e, portanto, é morta (GREEN; VICTOR, 2012).

A morte celular no sistema nervoso é um importante processo para o desenvolvimento normal. No entanto, após o stress celular, lesão cerebral, trauma, ou isquemia, a morte das células torna-se irregular e leva a resultados patológicos em doenças neurodegenerativas e acidente vascular cerebral. Em geral, a morte celular é um fenômeno complexo que envolve múltiplas vias. O mecanismo de apoptose é uma via de morte celular que envolve a ativação sequencial de eventos bioquímicos, sendo as caspases seus principais elementos. O mecanismo de necrose, por outro lado, envolve o inchaço celular e a ruptura das membranas celulares, o que é morfologicamente ou bioquimicamente distinto da apoptose. O mecanismo de autofagia foi recentemente descrito como uma via de morte celular associada a desordens neurodegenerativas. Originalmente autofagia foi identificada a desempenhar um papel em organelas e proteínas de reciclagem. Apoptose,

necrose, ou autofagia, embora considerados três modos distintos de morte celular, podem compartilhar características bioquímicas comuns para a execução morte (ANDRABI; DAWSON; DAWSON, 2008).

No infarto, os neurônios morrem pelo mecanismo de necrose, principalmente na zona central, bem como pelo mecanismo de apoptose, particularmente na margem interna do infarto (GUÉGAN et al., 1996; LI et al., 1995). A presença de células apoptóticas na penumbra ou zona peri-infartada, sugere que a apoptose pode contribuir para o tamanho da área final de infarto e que isso pode ser reduzido com tratamento farmacológico adequado (SOBRADO et al., 2003). Assim, a duração e a gravidade do processo isquêmico determinam se as células podem sofrer uma rápida morte por necrose devida à sua lise, ou uma deteriorização controlada e mais lenta, culminando na morte por apoptose (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007).

1.3.1 Vias de apoptose independente de Caspases (PARP e AIF)

O polímero poli (ADP-ribose) (PAR) tem estado sob análise por muitas décadas, devido a sua influência na progressão da mitose, nos mecanismos de reparo do DNA, no controle de transcrição e na morte celular independente de caspase. Tradicionalmente, PAR é produzido em resposta ao dano no DNA, mas o seu papel na morte celular sugere que as alterações para a síntese ou o metabolismo de PAR podem ser opções terapêuticas interessantes para uma variedade de doenças. O papel direto do PAR na morte celular é complexo; acreditava-se inicialmente que as células que passassem a produzir grandes quantidades de PAR iriam morrer através da depleção da energia, mas, recentemente, descobriu-se que a própria PAR é um sinal indutor de morte (HEERES; HERGENROTHER, 2007).

A principal enzima responsável pela produção de polímeros de PAR é a poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), correspondendo a mais de 99% da síntese de PAR na célula durante o estresse genotóxico (SALLMANN et al., 2000; HASSA et al., 2006). A morte de células dependentes de PARP-1 é independente de caspase e é designada parthanatos (ANDRABI; DAWSON; DAWSON, 2008).

A PARP-1 é uma proteína nuclear abundante que está envolvida na reparação de excisão do sistema de bases do DNA, que é potentemente ativada por entalhes e quebras da cadeia de DNA (YU et al., 2003; SZABO; DAWSON, 1998). Usando NAD^+ como um substrato, a PARP-1 acumula homopolímeros de unidades de ribose do ADP em diversas proteínas nucleares, incluindo histonas, polimerases de DNA, topoisomerases, a DNA-ligase-2, fatores de transcrição (SHALL; DE MURCIA, 2000; SMULSON et al., 2000), e PARP-1 em si (OLIVER et al., 1997; DE MURCIA et al., 1994).

Embora a função fisiológica exata de PARP-1 não seja completamente compreendida, em alguns tecidos ela desempenha um papel importante na reparação do DNA e a estabilidade genômica (OLIVER et al., 1997; NICOLETTI; STELLA, 2003; HASSA; HOTTIGER, 2002). O catabolismo e o metabolismo de Poly (ADP-ribose) (PAR) é um processo dinâmico, com PAR glicohidrolase (PARG) desempenhando um papel importante na degradação do polímero (LIN et al., 1997).

O polímero PAR atua como uma molécula sinalizadora que induz a morte celular após a ativação de PARP-1 (ANDRABI et al., 2006). Durante a morte celular dependente de PARP-1, uma grande quantidade de polímero PAR é formada através do consumo de estoques de NAD^+ intracelular (VIRAG; SZABO, 2002). A ativação excessiva da PARP-1 leva a um programa de morte celular intrínseca e única onde o polímero PAR participa na morte celular dependente de PARP-1. Medidas que interferem nas ações da PAR podem oferecer abordagens terapêuticas inovadoras para tratar a lesão celular (ANDRABI et al., 2006).

Danos no DNA em situação de estresse celular levam à ativação de PARP-1 que utiliza NAD^+ como um substrato e transforma-se em PAR (automodificação) e em várias proteínas aceptoras (heteromodificação) no núcleo. PARG pode hidrolisar PAR no núcleo para gerar PAR livre ou ADP-ribose. O acúmulo de PAR induz a morte celular. O PAR é gerado principalmente no núcleo e transloca-se para o citosol seja como polímero ligado a proteínas poli (ADP-ribosil) ou como um polímero livre (figura 1) (ANDRABI; DAWSON; DAWSON, 2008).

Isoformas de PARG no citosol podem degradar PAR quando presentes em quantidades ideais em relação ao PAR gerado. No citosol, PAR interage com a mitocôndria para induzir a liberação AIF (fator de indução da apoptose) que se transloca até o núcleo e se liga ao DNA mediando sua fragmentação em grande escala, proporcionando a morte celular (ANDRABI; DAWSON; DAWSON, 2008).

A proteína AIF está associada com a morte das células nervosas. A activação excessiva de poli polimerase de ADP-ribose (PARP) nuclear envia o sinal para a mitocôndria, provocando libertação de AIF da mitocôndria para o núcleo da célula provocando fragmentação de DNA e condensação de cromatina (LEE et al., 2004). AIF é uma oxiredutase mitocondrial. E, como o citocromo c, tem duas funções independentes: uma dentro da mitocôndria, envolvida na sobrevivência celular, provavelmente por montagem ou estabilização do complexo respiratório I (CHEUNG et al., 2006), e outra como uma promotora de morte celular, devido a ativação de PARP-1, que libera AIF para o citoplasma que entrará no núcleo para induzir a morte celular (DAVID; ANDRABI; DAWSON, 2009; KANG et al., 2004; YU et al., 2002).

Esta via de suicídio celular tem sido implicada em várias situações clínicas, tais como acidente vascular cerebral, isquemia do miocárdio, diabetes, disfunção cardiovascular associada à diabetes, choque e lesões do sistema nervoso central por trauma, etc (SIRIAM et al., 2014; SIRIAM et al., 2015).

Figura 1 - Ativação da PARP-1 e o papel do PAR em parthanatos.

FONTE: Adaptado de ANDRABI; DAWSON; DAWSON, 2008.

1.4 O micro-RNA-9

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de genes não codificadoras com aproximadamente 22 nucleotídeos. Eles desempenham um papel importante na regulação de genes alvo através da ligação a regiões complementares de transcrições do RNA mensageiro (3'UTR) de uma forma dependente da complementaridade para suprimir a sua tradução ou regular sua degradação (BARTEL, 2004; FILIPOWICZ et al., 2005; SONTHEIMER; CARTHEW, 2005; MARTIENSSEN, 2005).

Os miRNAs estão envolvidos em funções celulares diversas como o tempo de desenvolvimento de vermes, morte celular e o metabolismo da gordura em moscas, hematopoiese em mamíferos, e o desenvolvimento da folha e desenhos com motivos florais nas plantas (AMBROS, 2004; KIDNER; MARTIENSSEN, 2005). Além disso, foi demonstrado que os miRNAs desempenham papéis críticos em uma ampla gama de processos biológicos fundamentais, incluindo a regulação do ciclo celular, a transformação oncogênica, regeneração e diferenciação das células tronco, diferenciação de células imunes, desenvolvimento de metazoários, a organogênese, a proliferação celular, diferenciação, apoptose e autofagia (MIRANDA et al., 2010; VALENCIA-SANCHES et al., 2006).

Há evidências crescentes de que a regulação da expressão de genes mediada por miRNAs é muito difundida e crítica em mamíferos. Além disso, foi provado que o miRNA desempenha um papel importante no desenvolvimento do cérebro e doenças relacionadas com o cérebro. Vários relatórios começaram a caracterizar os perfis de expressão de miRNA após isquemia cerebral utilizando *microarrays*, inferindo que miRNA pode estar envolvido na patogênese da isquemia cerebral (WANG et al., 2014). Experiências clínicas de investigação em animais indicam que os miRNAs são potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos para isquemia cerebral (GUO et al., 2014; HUANG et al., 2015).

Devido à sua localização e enriquecimento específico, alguns deles são altamente expressos no cérebro, incluindo o miR-9, o miR-124, o miR-132, o miR-128, e assim por diante (LIU et al., 2015). Entre eles, miR-9 tem despertado a atenção dos neurobiologistas devido à sua alta conservação de sequência em animais bilaterianos, e sua expressão elevada e específica no sistema nervoso

central (SNC) de vertebrados. Como a sua função e espectro de ação começa a ser desvendado, este microARN prova ser altamente versátil, exercendo diversas e, por vezes, opostas atividades dependendo da espécie e do contexto celular (COOLEN; KATZ; BALLY-CUIF, 2013). Nos roedores, o miR-9 é abundante em regiões neurogênicas tanto em embriões quanto em adultos (DEO et al., 2006). Ele tem sido implicado na regulação dos canais BK do mRNA em resposta ao álcool (PIETRZYKOWSKI et al., 2008), na diferenciação de células embrionárias Cajal-Retzius (SHIBATA et al., 2008), e diferenciação progenitora neuronal em adultos (ZHAO et al., 2009). No geral, a complexa dinâmica e os mecanismos de ação do miRNA-9 ainda permanece incompreendida (COOLEN et al., 2012).

Portanto, elucidar o papel de microRNAs que possam regular importantes proteínas envolvidas no mecanismo de apoptose associados a isquemia cerebral assim como a possíveis danos causados pelo consumo crônico de álcool, droga com ampla repercussão na sociedade mundial, pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagem diagnóstica para estas doenças.

Objetivo

2 OBJETIVO

Analisar o perfil de expressão das proteínas PARP e AIF, relacionadas ao mecanismo de apoptose, assim como o perfil de expressão gênica sérica do microRNA-9 em ratos submetidos à isquemia cerebral focal associado a modelo de alcoolismo crônico.

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Para este estudo foram utilizados 40 ratos machos da raça *Rattus Norvegicus Albinus*, da variedade Wistar, pesando aproximadamente entre 280 a 310 gramas, fornecidos pelo Serviço de Biotério do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto – USP-RP.

Os animais foram mantidos em condições-padrão, 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), com ciclo de luz de 12 horas, sob temperatura e umidade relativa do ar controladas, em gaiolas apropriadas e submetidos a uma alimentação padrão de ração sólida balanceada para ratos de laboratório (Nuvilab - Nuvital) e água *ad libitum* até a eutanásia. O projeto dos experimentos realizados neste estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos:

O grupo C (controle): constituído por 10 animais que após a anestesia e a estabilização das variáveis biológicas, foram sacrificados sem a realização do procedimento cirúrgico.

O grupo I (isquêmico): constituído por 10 animais submetidos à isquemia focal por oclusão da ACM durante 90 minutos, seguido por reperfusão de 48 horas, e em seguida foram sacrificados.

O grupo A (alcoolizado): constituído por 10 animais que foram receberam etanol diluído a 20% em água pelo período de quatro semanas e em seguida foram sacrificados.

O grupo IA (isquêmico e alcoolizado): constituído por 10 animais que foram submetidos ao mesmo protocolo de isquemia do grupo I e que receberam etanol diluído a 20% em água pelo período de quatro semanas e em seguida foram sacrificados.

3.3 Protocolo de alcoolização

Para a realização do protocolo de alcoolização, os animais do grupo IA foram submetidos ao modelo de “alcoolismo semi-voluntário”, onde há o fornecimento de etanol, diluído em água, como única fonte de alimento líquido disponível a esses animais.

Inicia-se com um período de habituação alcoólica, que consiste no fornecimento de etanol diluído em água a uma concentração inicial de 5% durante uma semana, sendo paulatinamente aumentada para 10% na segunda semana e para 20% na terceira semana, dando início então ao procedimento cirúrgico de isquemia cerebral após a terceira semana de alcoolização.

3.4 Preparação do animal para o procedimento cirúrgico

Os animais de cada grupo foram submetidos à anestesia geral por inalação de halotano, sob uma campânula de vidro e então eram transferidos para uma prancha de madeira após a cessação da movimentação espontânea e eram mantidos em decúbito dorsal, fixados com esparadrapos à prancha de madeira pelos seus membros. Após esse posicionamento, era realizada a intubação manual com uma cânula orotraqueal, após a tração digital da língua anteriormente (figura 2).

A extremidade da cânula foi conectada a um respirador desenvolvido para animais de pequeno porte (CR-BION – Ribeirão Preto, Brasil), com manutenção da pressão endotraqueal entre 8 a 10 mmHg (figura 3). Após a conexão da cânula ao respirador, iniciava-se então a vaporização contínua com halotano.

Figura 2 - Animal fixado à prancha de madeira e intubado com cânula orotraqueal (→ extremidade da cânula).

Figura 3 - Respirador desenvolvido para animais de pequeno porte (CR-BION – Ribeirão Preto, Brasil). Cânula orotraqueal (→).

A artéria ventral da cauda foi dissecada e canulada (Figura 4) com cateter calibre PE 10, que conectado na outra extremidade a um cateter peridural, eram conectados a um transdutor de pressão, para registro contínuo da pressão arterial

média e da frequência cardíaca (biomonitor modelo 78339A – Hewlett Packard Company, USA) e para coleta de amostras sanguíneas.

Figura 4 - Detalhe da artéria ventral da cauda do rato após canulação.

FONTE: TIRAPELLI, 2011 (Com permissão)

A manutenção da vaporização de halotano era controlada de acordo com a pressão arterial média, para que fosse mantida entre 80 e 100 mmHg. Após quinze minutos de ventilação mecânica e nos quinze minutos finais da isquemia, era colhida uma amostra de sangue arterial para a realização de gasometria (gasômetro portátil modelo I-STAT portable clinical analyse - ABBOTT Laboratories Inc.) com utilização de cartucho I-STAT cartridge cg8+, para dosagens da $paCO_2$, da paO_2 e do pH e dosagem de glicemia, hemoglobina e hematócrito.

Quando os valores de pCO_2 não estavam dentro dos parâmetros aceitáveis (entre 34 e 42 mmHg), era então realizado um novo exame para verificar os parâmetros gasométricos. Para a manutenção desses parâmetros, alterações na pressão endotraqueal ou na frequência do respirador eram realizadas.

A temperatura corporal foi controlada com um termômetro digital posicionado no reto do animal e mantida entre 37 - 38°C. Quando necessário, era utilizado uma fonte de calor (lâmpada incandescente 220 V) para a manutenção dessa temperatura.

Após a estabilização do animal, o procedimento cirúrgico para indução da isquemia era iniciado.

3.5 Procedimento cirúrgico para a realização da isquemia seguida de perfusão

O procedimento cirúrgico para a realização da isquemia era realizado através da oclusão da ACM.

Foi realizada a tricotomia da região cervical anterior, com posterior incisão mediana da pele, tela subcutânea e do músculo platísmo, seguida pelo tracionamento digital lateral até a exposição do músculo esternomastóideo infero-lateralmente, o músculo omohióideo látero-superiormente e o músculo esternohióideo medialmente (Figura 5 A e B).

Figura 5 – Desenho (A) e foto (B) ilustrando a incisão mediana na região ventral e cervical do rato com afastamento lateral da pele com 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 esternohióideo (EH); músculo esternomastóideo (EM); músculo masséter (M); músculo omohióideo (OH); músculo trapézioclavicular (TC).

FONTE DO DESENHO (A): TIRAPELLI, 2007 (Com permissão)

O campo operatório foi exposto com dois afastadores tipo gancho, com leve tração, sendo um medial e outro lateral, e fixados com esparadrapos na prancha, para facilitar a visualização das estruturas anatômicas.

Posteriormente, o microscópio cirúrgico (DF – Vasconcelos) era introduzido no campo operatório para a identificação e exposição bainha carótida (Figura 6) e então da artéria carótida comum esquerda (ACCE).

Figura 6 - Fotografia mostrando afastamento da musculatura cervical superficial no antímero esquerdo com exposição da bainha carótida (→).

A dissecação prosseguia superiormente até sua bifurcação com a identificação da artéria carótida interna esquerda (ACIE) e da artéria carótida externa esquerda (ACEE) (Figura 7 A e B).

Figura 7 - (A) Desenho e (B) fotografia representando a exposição das artérias carótidas comum esquerda (CCE), carótida interna esquerda (CIE) e carótida externa esquerda (CEE) com alguns dos seus ramos cervicais (*), após afastamento da musculatura cervical superficial.

FONTE DESENHO A: TIRAPELLI, 2007 (Com permissão)

A ACE foi dissecada no sentido cranial e seus ramos coagulados e seccionados (Figura 8 A e B). A ACI também foi dissecada em todo o seu trajeto extracraniano, incluindo a origem da artéria pterigopalatina e sua continuação cranial (Figura 8 A).

Figura 8 - Desenho (A) e fotografia (B) ilustrando os ramos colaterais da ACE (setas) coagulados, após dissecação das artérias CCE, CIE e do seu ramo cervical, a PPE (apenas em A).

FONTE DESENHO A: TIRAPELLI, 2007 (Com permissão)

A ACE foi ligada o mais cranial possível com fio de algodão (4.0 – Ethicon), para a introdução retrógrada do fio obstrutor de mononylon 4-0 (2,5 cm de comprimento) com extremidade engrossada com mistura de silicone na extensão de 5mm (por KOIOSUMY et al. (1986); modificada por CARLOTTI JR; COLLI; KAZUO, 2001), preparado previamente. Para a preparação dos fios, os mesmos foram mantidos estendidos durante 24 horas para corrigir as curvaturas formadas pela posição em que são embalados, e em seguida, foram seccionados em segmentos de 25mm, com lâmina de barbear de aço, e por fim, colocados entre as folhas de um livro, deixando-se uma de suas extremidades livre. Esta extremidade foi recoberta com uma camada 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, com a utilização de

microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos). A mistura foi colocada na extremidade de uma pinça de microcirurgia e então distribuída suavemente sobre o fio, para a maior uniformidade possível. A extensão da camada de silicone utilizada foi de 5mm, medida com uma régua milimétrica colocada ao lado do fio durante o procedimento (Figura 9).

Figura 9 - Fio obstrutor, extensão de 2,5 cm e extremidade espessada com silicone (→).

FONTE: TIRAPELLI, 2007 (Com permissão)

Foram colocados microclipes temporários junto à emergência da APP, para impedir a migração do fio obstrutor para o interior da sua luz; na ACC, para interromper o seu fluxo e, na continuação cranial da ACI, para evitar o refluxo de sangue (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Figura 10 – Desenho (A) e fotografia (B) ilustrando a clampagem da porção inicial da ACI (seta).

FONTE DESENHO: TIRAPELLI, 2007 (Com permissão)

Figura 11 - Fotografia ilustrando a ligadura da porção proximal da ACEE (seta), a clampagem da ACCE e da APPE.

FONTE: TIRAPELLI, 2011

Figura 12 – Desenho (A) e fotografia (B) ilustrando a ligadura da porção proximal da ACEE (seta), a clampagem da ACCE (A), ACIE (B) e APPE (C) e a secção proximal da artéria carótida externa esquerda (*).

FONTE: TIRAPELLI, 2007 (Com permissão)

Figura 13 - Desenho ilustrando a posição correta da ACEE (seta) para a introdução do fio obstrutor. Novamente: clampagem da ACCE (A), ACIE (B) e APPE (C).

FONTE: TIRAPELLI, 2007 (Com permissão)

A ACE foi seccionada e a partir do seu coto proximal, foi introduzido o fio obstrutor retrogradamente pela ACC e depois cranialmente pela ACI (Figuras 14 a 18), após a retirada do microclipe que ocluía este vaso, até sentir resistência na sua progressão. Os microclipes da ACC e da APP permaneceram no local (Figura 14).

Figura 14 – A: Fotografia ilustrando o local da secção da ACE. B: Fotografia ilustrando 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.*

Em seguida, foi medida a distância da bifurcação da ACC até o coto proximal do fio obstrutor, com valor aceitável entre 0.5-0.7 cm, sendo, portanto, a medida do segmento do fio entre a bifurcação da ACC e a sua extremidade distal de 18 a 20 mm. Isto indicava que o fio penetrou o suficiente para ocluir o óstio de origem da ACM (Figura 21) (CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001; KOIOSUMY et al., 1986). As figuras 15 e 16 mostram a permanência do microclipe apenas na ACCE.

Figura 15 - Desenho ilustrando a introdução do fio obstrutor (seta) no interior da ACEE em direção à ACCE e ACIE (A), após a retirada dos microclipes da ACIE e APPE.

FONTE: TIRAPELLI, 2007 (Com permissão)

Figura 16 - Fotografia com detalhe da posição do fio obstrutor (seta) no interior da ACEE em direção à ACCE e ACIE, com permanência do microclipe na ACCE.

O coto da ACE foi ligado com fio 10-0 para evitar refluxo de sangue e o microclipe da ACCE foi retirado, permitindo sua reperfusão (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - A. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME (M) (no detalhe superior direito) e a ligadura da ACEE na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). Por fim, a reperusão da ACCE (C) é permitida após a retirada do seu microclipe. Artéria carótida interna esquerda (I); artéria cerebral anterior esquerda (A); artéria pterigopalatina esquerda (P).

FONTE: TIRAPELLI, 2007 (Com permissão)

Figura 18 - Fotografia final do procedimento cirúrgico com a introdução completa do fio obstrutor (seta).

Os animais foram mantidos em condições estáveis durante o período de isquemia. Depois de decorrido o período de 90 minutos de isquemia focal, procedia-se a retirada do fio obstrutor, recolocando o clampe temporário na ACC e ACI para evitar o fluxo de sangue na primeira e o refluxo na segunda. Ligava-se definitivamente o coto proximal da ACE (fio de algodão 4.0 – Ethicon) e retiravam-se os clampes temporários. Em seguida a pele e a tela subcutânea eram fechadas com fio mononylon 3-0.

Após a reperfusão, os parâmetros vitais eram observados e, em seguida, era feita a sutura contínua da pele com fio mononylon 5-0. Uma vez estável o animal, o anestésico inalatório era suspenso, permitindo sua recuperação e, após a retomada da respiração espontânea, a cânula orotraqueal era retirada e o animal era recolocado à sua gaiola plástica, com oferta livre de água e ração.

3.6 Retirada do encéfalo

Após decorrido o período de reperfusão previsto (48 horas), o animal foi anestesiado através da inalação de halotano (colocado sob uma campânula de vidro) e em seguida, foi posicionado em decúbito dorsal em uma prancha de madeira.

A retirada do encéfalo era iniciada com uma tesoura Mayo, através de um corte transversal na região nuchal para a separação do crânio da coluna vertebral cervical (Figura 19 A e B).

Figura 19 - A. Retirada da pele para incisão cervical (B).

Em seguida foi efetuado um corte interorbital (Figura 20), seguido de um corte sagital occipito-frontal, que permitia o afastamento lateral dos ossos por meio de tração digital auxiliado por pinças hemostáticas. Dessa forma, o encéfalo era exposto (Figura 20) e removido após secção dos nervos cranianos, utilizando-se

uma micro pinça. Durante estes procedimentos, os encéfalos foram submetidos à irrigação contínua com soro fisiológico à 0°C em uma placa de Petri.

Figura 20 - Corte interorbital.

Figura 21 - Exposição do encéfalo.

O encéfalo isolado (Figura 22) foi colocado em um molde de aço (Figura 23) e seccionado em cortes coronais de 2mm (Figura 24 A e B).

Figura 22 - Encéfalo isolado.

Figura 23 - Molde de aço (Matrix – ASI – Instruments – CBM – 2000C U.S.A.).

Figura 24 - A. Visão ventral do encéfalo isolado colocado sobre molde de aço. B. Posição da gilete ao nível do corte coronal para coleta.

Para o estudo de imunohistoquímica (IH), foi selecionado apenas um dos cortes coronais (2mm) cuja secção foi realizada: na região anterior ou rostral passando (1) inferiormente através do quiasma óptico; (2) imediatamente anterior à comissura anterior e terceiro ventrículo; (3) superiormente através do tronco do corpo caloso e porção central do ventrículo lateral (Figura 25 e 26).

É importante ressaltar que os cortes coronais (3µm) para a preparação das lâminas da avaliação imunohistoquímica foram realizados a partir desta região rostral em direção posterior (Figura 26).

Figura 25 - Corte coronal do encéfalo obtido a partir do molde de aço. Corpo caloso (setas).

Após a obtenção do corte coronal, era iniciada a perfusão manual de solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,3 em temperatura ambiente.

Figura 26 - Corte sagital mediano com visão das principais estruturas observadas no encéfalo de rato adulto. A linha A – anterior ou rostral (em azul) indica o nível do corte coronal utilizado para avaliação pela IH. Aqueduto cerebral (AC); bulbo olfatório (BO); comissura anterior (CA); corpo caloso (CC); cerebelo (CE); cíngulo (CG); hipocampo (H); glândula pineal (P); ponte (PO); quiasma óptico (QO); tálamo (TA); teto mesencefálico (TE); terceiro ventrículo (III); quarto ventrículo (IV).

FONTE: TIRAPELLI, 2011 (Com permissão)

Para a avaliação pela IH, três regiões específicas delineadas na Figura 27, foram avaliadas, pois correspondem às principais regiões do cérebro correspondente aos locais de irrigação a partir da ACM (Figura 28).

Figura 27 - Desenhos dos cortes coronais do encéfalo nas regiões avaliadas, mostrando à esquerda a ACM e alguns dos seus ramos e à direita, as três áreas avaliadas neste estudo: córtex dorsolateral (1); córtex lateral (2), e striatum (3). A. Corte coronal anterior ou rostral. Artéria cerebral média (ACM) originando várias pequenas artérias subcorticias perfurantes ou centrais (); artéria estriada anterior (AEA) – ramo da ACM. Comissura anterior (CA); ventrículo lateral (VL). B. Corte coronal posterior com ACM emitindo a artéria estriada posterior (AEP). Corpo caloso (CC). Cápsula externa (CE); cápsula interna (CI); terceiro ventrículo (III).*

FONTE: TIRAPELLI, 2011 (Com permissão)

3.7. Avaliação da isquemia cerebral experimental

3.7.1. Análise das amostras

3.7.1.1. Análise imunohistoquímica

Para cinco animais de cada grupo, os cortes coronais do tecido cerebral fixados por imersão em paraformaldeído a 4% e incluídos em parafina conforme descrito anteriormente, foram submetidos 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 cerebral com anticorpos relacionados ao mecanismo de apoptose: PARP 1 e AIF.

Inicialmente, cortes de 3µm 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 (Krupps North America Inc., Millville, Nova Jérsei, EUA) com tampão citrato a 10mM 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 os anticorpos primários: PARP 1 (CP 229-B, Biocare Medical) diluído a 1/300 em solução de PBS em albumina bovina sérica (bovine serum albumine – BSA) a 1,5%; e AIF (sc-7382 / Santa Cruz) diluído em 1/200 em solução 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).

A leitura da expressão das proteínas estudadas foi realizada em microscópio (Axioskop 2 plus, Zeiss, Alemanha) em aumento de 400x. Dois parâmetros foram analisados:

A) Porcentagem de células positivamente marcadas (neurônios e células da neurógliia) na área 1 (córtex dorsolateral) e área 2 (córtex lateral), ambos do hemisfério cerebral esquerdo. Para a contagem, dois campos em aumento de 400x, para cada área em estudo (1 e 2 – Figura 28), foram escolhidos nas regiões do córtex (camadas): um campo medial e um campo lateral. Contudo, em cada campo escolhido, a contagem foi realizada na(s) camada(s) onde havia maior marcação positiva (regiões de “hot spot”) para a respectiva proteína em estudo (PARP 1 e AIF). A partir da contagem do número total de células positivas e negativas, foi calculada a porcentagem de células positivas.

B) Porcentagem de células positivamente marcadas (neurônios e células da neurógliia) no corpo estriado (striatum - área 3) do hemisfério cerebral esquerdo. Para a contagem das células, foram escolhidos dois campos em aumento de 400x: um campo medial e um campo lateral (Figura 28). Contudo, em cada campo escolhido, a contagem foi realizada na região onde havia maior marcação positiva das células (regiões de “hot spot”) para a respectiva proteína em estudo (PARP 1 e AIF). A partir da contagem do número total de células positivas e negativas, foi calculada a porcentagem de células positivas.

Figura 28 - Corte coronal do encéfalo mostrando os campos medial (M) e lateral (L) demarcados para as três áreas de avaliação no estudo IH: área 1 – córtex dorsolateral (em verde); área 2 – córtex lateral (em vermelho); e, área 3 - striatum (em azul).

FONTE: TIRAPELLI, 2011 (Com permissão)

A Figura 29 (fotomicrografia do striatum) demonstra como foram realizadas as contagens das células positivas e negativas no estudo IH.

Figura 29 - Striatum do rato 1 do grupo A1 após contagem das células positivas à AIF (pontos vermelhos) e células negativas (pontos azuis) em campo com aumento de 400x.

3.7.1.2 Análise da expressão gênica sérica do microRNA-9

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).

A) 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 (Figura 34A), a amostra foi centrifugada por 10' a 2500 rpm.

Adicionou-se 250µl 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.

B) Síntese de DNA complementar (cDNA) do miRNA-9

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.

C) PCR em tempo real

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a expressão diferencial do miRNA-21. 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 do miRNA-9.

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 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico Taqman Master Mix, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA. 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 ΔCT . 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”.

3.8 Análise estatística

Para a avaliação de todos os estudos desta pesquisa (da expressão protéica e da expressão 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 4.00 for Windows, (GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA), sendo considerado estatisticamente significante valores de $p < 0.05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise imunohistoquímica de PARP-1

4.1.1 Área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CDL)

Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína PARP-1 em todos os grupos analisados. A comparação entre os grupos identificou uma redução da expressão proteica de PARP-1 nos animais do grupo AI quando comparado com os demais ($p=0,0014$ teste Kruskal-Wallis). Houve diferença estatística nas comparações entre o grupo C *versus* AI ($p=0,0079^{**}$) e o grupo A *versus* AI ($p=0,0119^{*}$), pós teste de Dunns (figura 30).

Figura 30 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de PARP-1 na área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CDL) nos grupos analisados ($p=0,0014$ teste Kruskal-Wallis). Grupo C *versus* AI ($p=0,0079^{**}$); grupo A *versus* AI ($p=0,0119^{*}$), pós teste de Dunns.

A figura 31 demonstra a fotomicrografia da análise de imunohistoquímica de PARP-1 no córtex dorsolateral (CDL) em cada um dos grupos estudados. Observa-se marcações positivas em todos os grupos, sendo de menor intensidade no grupo AI.

Figura 31 - Fotomicrografia do córtex dorsolateral (CDL) da imunohistoquímica de PARP-1. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para PARP-1 estão identificadas pelas setas. Observa-se menor marcação positiva no grupo AI. 400x.

4.1.2 Área 1 e 2 do córtex lateral (CL)

Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína PARP-1 em todos os grupos analisados. A comparação entre os grupos identificou uma redução da expressão proteica de PARP-1 nos animais do grupo AI quando comparado com os demais ($p=0,0045$ teste Kruskal-Wallis). Houve diferença estatística nas comparações entre o grupo C *versus* AI ($p=0,0159^*$) e o grupo A *versus* AI ($p=0,0079^*$), pós teste de Dunns (figura 32).

Figura 32 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de PARP-1 na área 1 e 2 do córtex lateral (CL) nos grupos analisados ($p=0,0045$ teste Kruskal-Wallis). Grupo C *versus* AI ($p=0,0159^*$); grupo A *versus* AI ($p=0,0079^*$), pós teste de Dunns.

A figura 33 demonstra a fotomicrografia da análise de imunohistoquímica de PARP-1 no córtex lateral (CL) em cada um dos grupos estudados. Observa-se marcações positivas em todos os grupos, sendo de menor intensidade no grupo AI.

Figura 33 - Fotomicrografia do córtex lateral (CL) da imunohistoquímica de PARP-1. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para PARP-1 estão identificadas pelas setas. Observa-se menor marcação positiva no grupo AI. 400x.

4.1.3 Área 1 e 2 do striatum (S)

Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína PARP-1 em todos os grupos analisados. A comparação entre os grupos identificou uma redução da expressão proteica de PARP-1 nos animais do grupo AI quando comparado com os demais ($p=0,0042$ teste Kruskal-Wallis). Houve diferença estatística nas comparações entre o grupo C *versus* AI ($p=0,0079^{**}$) e o grupo A *versus* AI ($p=0,0079^{**}$), pós teste de Dunns (figura 34).

Figura 34 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de PARP-1 na área 1 e 2 do striatum (S) nos grupos analisados ($p=0,0042$ teste Kruskal-Wallis). Grupo C *versus* AI ($p=0,0079^{**}$); grupo A *versus* AI ($p=0,0079^{**}$), pós teste de Dunns.

A figura 35 demonstra a fotomicrografia da análise de imunohistoquímica de PARP-1 no striatum (S) em cada um dos grupos estudados. Observa-se marcações positivas em todos os grupos, sendo de menor intensidade no grupo AI.

Figura 35 - Fotomicrografia do striatum (S) da imunohistoquímica de PARP-1. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para PARP-1 estão identificadas pelas setas. Observa-se menor marcação positiva no grupo AI. 400x.

4.2 Análise imunohistoquímica de AIF

4.2.1 Área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CDL)

Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína AIF somente no grupo AI. A comparação entre os grupos identificou aumento da expressão proteica de AIF nos animais do grupo AI quando comparado com os demais ($p=0,0003$ teste Kruskal-Wallis). Houve diferença estatística nas comparações entre o grupo C *versus* AI, o grupo A *versus* AI e no grupo I *versus* pós teste de Dunns (figura 36).

Figura 36 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de AIF na área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CDL) nos grupos analisados ($p=0,0003$ teste Kruskal-Wallis).

A figura 37 demonstra a fotomicrografia da análise de imunohistoquímica de AIF no córtex dorsolateral (CDL) em cada um dos grupos estudados. Observa-se marcações positivas somente no grupo AI.

Figura 37 - Fotomicrografia do córtex dorsolateral (CDL) da imunohistoquímica de AIF. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para AIF estão identificadas pela seta. Observa-se marcação positiva somente no grupo AI. 400x.

4.2.2 Área 1 e 2 do córtex lateral (CL)

Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína AIF somente no grupo AI. A comparação entre os grupos identificou aumento da expressão proteica de AIF nos animais do grupo AI quando comparado com os demais ($p=0,0187$ teste Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística nas comparações entre os grupos pós teste de Dunns (figura 38).

Figura 38 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de AIF na área 1 e 2 do córtex dorsolateral (CL) nos grupos analisados ($p=0,0187$ teste Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos.

A figura 39 demonstra a fotomicrografia da análise de imunohistoquímica de AIF no córtex lateral (CL) em cada um dos grupos estudados. Observa-se marcações positivas somente no grupo AI.

Figura 39 - Fotomicrografia do córtex lateral (CL) da imunohistoquímica de AIF. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo AI. As células marcadas positivamente para AIF estão identificadas pela seta. Observa-se marcação positiva somente no grupo AI. 400x

4.2.3 Área 1 e 2 do Striatum (S)

Foi observada marcação positiva nuclear para a proteína AIF somente no grupo AI. A comparação entre os grupos identificou aumento da expressão proteica de AIF nos animais do grupo IA quando comparado com os demais ($p=0,0187$ teste Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística nas comparações entre os grupos pós teste de Dunns (figura 40).

Figura 40 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de AIF na área 1 e 2 do striatum (S) nos grupos analisados ($p=0,0187$ teste Kruskal-Wallis). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos.

A figura 41 demonstra a fotomicrografia da análise de imunohistoquímica de AIF no striatum (S) em cada um dos grupos estudados. Observa-se marcações positivas somente no grupo IA.

Figura 41 - Fotomicrografia striatum (S) da imunohistoquímica de AIF. A: grupo C; B: grupo A; C: grupo I; D: grupo IA. As células marcadas positivamente para AIF estão identificadas pela seta. Observa-se marcação positiva somente no grupo IA. 400x

4.3 Análise da expressão gênica sérica do miRNA-9

A figura 42 representa a expressão sérica do miR-9 e mostra baixa expressão em todos os grupos, sendo maior nos animais dos grupos C, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,3309$, teste Kruskal-Wallis).

Figura 42 - Representação da média e desvio padrão da expressão gênica sérica do miRNA-9 entre os grupos estudados.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O acidente vascular cerebral isquêmico é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade na população adulta (MOZAFFARIAN et al., 2015). A patogênese é complexa e envolve uma miríade de vias moleculares distintas (XIAN et al., 2016).

O acidente vascular cerebral continua a ser extremamente difícil de gerir devido aos graves efeitos colaterais das drogas utilizadas na clínica médica (LAPCHAK, 2011). O único tratamento farmacológico aprovado para AVC isquêmico agudo consiste na trombólise com ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA). No entanto, menos de 5% dos pacientes recebem a terapia de rt-PA (CRONIN, 2010). De fato, a janela terapêutica do rt-PA é muito curta: 4,5 h após o início dos sintomas (HACKE et al., 2008). Além disso, rt-PA agrava hemorragia intracerebral pós-isquêmica, também chamados de transformações hemorrágicas (HT) (DEREK; NIGOGHOSSIAN, 2008; HAC et al., 2004). Desta forma, estratégias terapêuticas destinadas a atenuação da lesão cerebral após o acidente vascular cerebral isquêmico têm sido um foco importante para os últimos 40 anos.

Por várias razões, uma das principais causas de insucesso do tratamento na prática clínica do acidente vascular cerebral é o tratamento de um único alvo terapêutico, ignorando as interações entre os vários componentes da unidade neuro vascular (UNV), apesar da natureza complexa e multifatorial da isquemia. Obviamente, isto não é suficiente para proteger os neurônios de insultos excitotóxicos. Para reduzir a lesão cerebral após a isquemia, é necessário resgatar todos os componentes celulares e estruturais da UNV. O conceito de UNV foi proposto pela primeira vez em 2003 (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003), e se refere a uma estrutura global e unidade funcional que inclui neurônios, células gliais, células endoteliais, pericitos, membranas basais, células microgliais e da matriz extracelular. A UNV enfatiza as interações dinâmicas entre seus componentes e sua influência importante sobre a fisiopatologia da isquemia (XUE et al., 2013).

No entanto, nenhuma das muitas estratégias neuroprotetoras estudadas em experimentos clínicos têm produzido os resultados esperados (O'COLLINS et al., 2006; SAVITZ; FISHER, 2007).

Portanto, uma abordagem plausível para lidar com acidente vascular cerebral isquêmico é através da inibição das vias de sinalização envolvidas no estresse oxidativo, nas respostas inflamatórias, e nos danos subsequentes de apoptose neuronal e morte (WANG et al., 2016).

A micróglia representa a primeira linha de defesa contra a lesão cerebral, e os astrócitos são as células mais abundantes no sistema nervoso central e proporcionam um suporte estrutural e nutritivo dos neurônios. No entanto, na fase inicial do processo de I/R do cérebro, a micróglia e os astrócitos ativados podem expressar uma variedade de citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio. Estudos anteriores relataram que a ativação precoce das células gliais contribui para uma maior dimensão da área de necrose, devido à interação da glia neuronal. Portanto, a supressão da ativação glial precoce é neuroprotetora (ALOISI, 2001).

Evidências sugerem que a fim de alcançar a neuro proteção pós-isquêmica *in vivo* é obrigatório poupar não só os neurônios, mas também outros tipos de células presentes no tecido cerebral. A fim de obter este objetivo é importante identificar alvos adequados possivelmente expresso na maioria dos tipos de células e nos últimos anos, alguns inibidores de poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1), administrado após isquemia cerebral, emergiram como ferramentas interessantes para reduzir o dano cerebral pós-isquêmico. Alguns estudos laboratoriais relataram que a ativação de PARP pode ser prejudicial para a maioria das células do cérebro e os inibidores da PARP podem reduzir os danos do tecido, melhorando a sobrevivência de neurônios, glia e outros tipos de células (MORONI; CHIARUGI, 2009; HAMBY et al., 2007; JAGTAP; SZABO, 2005; KOH et al., 2005).

Além disso, foi demonstrado que a administração de rt-PA após isquemia cerebral aumenta a ativação de PARP-1 (CROME et al., 2007).

Para Moroni e Chiarugi (2009), a proteção dos componentes da unidade neurovascular parece, portanto, essencial para reduzir a lesão cerebral e déficits neurológicos após um acidente vascular cerebral. Para conseguir isso, diferentes estratégias têm sido propostas e avaliadas em exames pré-clínicos. No entanto, alvos concomitantes de todos os componentes das unidades neurovasculares adiciona complexidade significativa a viabilidade da obtenção de neuroproteção isquêmica por abordagens farmacológicas e ainda há o ceticismo geral que permeia esse campo. Estes autores reivindicam que inibidores da poli (ADP-ribose)

polimerase (PARP-1) estão entre os mais eficazes protetores da unidade neurovascular atualmente disponíveis.

Recentes achados de vários modelos de isquemia cerebral têm demonstrado que a ativação direta de poli (ADP-ribose) polimerases (PARPs), especialmente de PARP-1, que é um mediador chave da lesão isquêmica, desempenha um papel importante na neuroproteção contra necrose cerebral e apoptose (CHIARUGI, 2005, KAUPPINEN et al., 2009, MATSUURA et al., 2011 e MORONI, 2008). Portanto, especula-se que a regulação da atividade de PARP-1 pode ser um dos meios mais eficazes de proteção da UNV atualmente disponíveis (ZHANG et al., 2015).

Zhang et al. (2015) confirmaram que o silenciamento do mRNA de PARP-1 reduziu o volume de infarto cerebral e edema e melhora da função neurológica, aliviando a apoptose neuronal celular, ruptura da barreira hematoencefálica, e os déficits sinápticos após isquemia cerebral focal.

Diversos estudos indicam que a inibição de PARP-1 e a translocação de AIF são medidas consistentes para promover a neuroproteção e efeitos anti apoptóticos após um processo de I/R em ratos (MORONI; CHIARUGI, 2009; CASTRI et al., 2014; XIAO-HONG; LI-PING; WEI, 2014; YU et al., 2015; ZHANG et al., 2015; GERACE et al., 2015; SRIRAM et al., 2016)

Nos estudos de Xiao-Hong, Li-Ping e Wei (2014), em um modelo de I/R em rato, as células apoptóticas apresentaram aumento da expressão de PARP, depleção de NAD e a translocação nuclear de AIF. Resultados semelhantes também foram encontrados nos estudos de Ba et al. (2014).

Em nosso estudo, a expressão de PARP-1 e de AIF, nos grupos dos animais que foram submetidos ao processo de I/R, em todas as regiões cerebrais analisadas (CDL, CL e S), não apresentaram diferenças estatísticas quando comparado com ao grupo controle.

Diversos estudos demonstram que a atividade enzimática de PARP-1 está aumentada após o processo de isquemia, embora a expressão da proteína não seja alterada (HU et al., 2013; NAGAYAMA et al., 2000; ZHAO et al., 2014).

Em nosso estudo a proteína PARP foi expressa tanto no grupo C quanto no grupo I, entretanto, AIF não estava expresso em nenhum desses grupos, o que pode ser evidenciado pelas fotomicrografias de imunohistoquímica, onde nenhuma célula foi marcada.

Nos estudos de Xiao-Hong, Li-Ping e Wei (2014), que realizaram isquemia em ratos por duas horas seguida de reperfusão por até 72 horas, os resultados demonstraram que a expressão AIF esteve aumentada 24 horas após a reperfusão em comparação com o momento de 6 horas e tornou a reduzir novamente com 72 horas após a reperfusão.

Desta forma, pode-se sugerir que o processo de I/R (90 minutos de isquemia seguida de 48 horas de reperfusão) proposto, pode não ter sido suficiente para promover a ativação de AIF nesse grupo e desta forma, a apoptose celular por essa via analisada.

De acordo com Yu et al. (2006) e Heeres e Hergenrother (2007), quando ocorre um leve dano no DNA, a ativação de PARP-1 resulta na poli (ADP-ribosilação) por si só, histonas, e outros fatores envolvidos no reparo do DNA e o controle transcricional. Estes efeitos levam à reparação de lesões do DNA e a sobrevivência celular. Em contraste, danos excessivos no DNA levam à super estimulação de PARP-1 que produz enormes quantidades de polímeros PAR, levando a translocação de AIF. A dissociação de PARP-1 em PAR, permite, em seguida, que PARP-1 se ligue aos danos dos filamentos de DNA novamente, consumindo cada vez mais NAD⁺ a medida que este ciclo continua. O acúmulo de PAR e a depleção de NAD⁺ pode levar ao processo de apoptose independente de caspase ou necrose.

Analisando nossos resultados podemos sugerir que baixa expressão de AIF no grupo I indica que o modelo de isquemia isolado possivelmente gerou leves danos no DNA o que estimulou a ativação de PARP-1 somente em níveis suficientes para promover a reparação do DNA e não a ativação do processo de apoptose pela translocação de AIF.

Nos estudos de Wang et al. (2011), os resultados demonstram que AIF é uma proteína de ligação de PAR e que a saída de AIF da mitocôndria para o citosol é dependente da ligação PAR/AIF após a ativação de PARP-1. Além disso, a ligação PAR/AIF é necessária para induzir a morte celular pela via dos partanatos.

A degeneração cerebral induzida pelo uso crônico de álcool (etanol) compreende uma das principais razões para déficits cognitivos em todo o mundo (CARLEN et al., 1994; ECKARDT; MARTIN, 1986; GUPTA; WARNER, 2008).

Em estudos recente com modelos experimentais de alcoolismo, o uso de etanol foi suficiente para causar a neurodegeneração substancial do cérebro (NUZHATH et al., 2013). Entretanto, a excitotoxicidade não é, aparentemente, o principal mecanismo da neurodegeneração (COLLINS; NEAFSEY, 2012); em vez disso, neuroinflamação e possivelmente vias neuroimunes, muitas vezes envolvendo o estresse oxidativo excessivo, são provavelmente mais relevantes (NUZHATH et al., 2013).

Desta forma, a PARP-1 está vinculada com os programas de morte celular e são desencadeadas pelo estresse oxidativo cerebral causada pela exposição ao etanol (CHERIAN; SCHENKER; HENDERSON, 2008; DAVID et al., 2009; COLLINS; NEAFSEY, 2012).

Conforme demonstrado em nossos resultados, o grupo AI apresentou uma redução significativa da expressão proteica de PARP-1, quando comparado com os demais grupos. Em contrapartida, proteína AIF apresentou maiores níveis de expressão apenas no grupo AI. Não foram encontrados dados na literatura que indicassem redução da expressão de PARP-1 em modelos de I/R associados ao uso crônico de álcool.

Nossos dados ainda diferem dos estudos de Nuzhath et al. (2013), que tiveram aumento dos níveis de PARP-1 em ratos adultos submetidos ao uso de etanol crônico mas que não foram submetidos ao modelo de I/R.

O efeito neuroprotetor de etanol foi relatado no estudo de Fua et al. (2013), onde foi observado que uma administração precoce (3 h pós-reperfusão) de 1,5 g/kg de etanol, proporcionou um aumento de proteínas pró-sobrevivência durante a reperfusão no rato, com aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 e a diminuição da expressão da caspase-3 pró-apoptótica, BAX e AIF, levando a uma diminuição da morte celular. Dados semelhantes também foram encontrados nos estudos de Yuan et al. (2012), porém com doses menores de etanol.

Entretanto, estes estudos avaliaram o efeito agudo do álcool, diferente de nossa análise. Já comparativamente ao nosso estudo, porém apresentando dados contrários, os resultados de Sunkesula, Swain e Babu (2008) que avaliaram o hipocampo e o córtex frontal de ratos tratados com etanol por 12 semanas, revelaram que o córtex frontal apresenta um nível mais elevado de apoptose

induzida por etanol em relação ao hipocampo, como evidenciado por um aumento da ativação de caspase-3 com subsequente clivagem da PARP-1; em comparação com os resultados dos controles e que o mecanismo de morte celular envolve ativação da caspase-3 e clivagem de PARP-1. Alguma imunorreatividade da caspase-3 foi também encontrada no cérebro controle, que pode ser explicado com base nos níveis basais de caspase nesse tecido. A clivagem dependente de caspase pode inativar proteínas envolvidas em mecanismos de reparação do DNA, tais como a PARP-1. Ainda neste estudo, a liberação de proteínas da mitocôndria para o citosol, entre elas a AIF, contribuiu para a apoptose em animais tratados com etanol no córtex frontal, o que foi observado pela translocação da AIF ao núcleo nesses animais. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que a AIF é a peça chave na morte celular por via independente de caspase nesta região (SUNKESULA; SWAIN; BABU, 2008).

Durante a última década, o papel central dos mecanismos epigenéticos no acidente vascular cerebral isquêmico está cada vez mais compreendido. Pesquisadores têm expandido suas investigações rápida e drasticamente para uma base molecular mais detalhada sobre mecanismos epigenéticos e seu importante papel no acidente vascular cerebral isquêmico (KOHYAMA et al., 2008). Neste sentido, foi comprovada que a expressão dos microRNAs apresenta-se alterada no sangue e cérebro de ratos submetidos a isquemia focal transitória, por oclusão da artéria cerebral média. Portanto, os miRNAs são supostamente potenciais biomarcadores para acidente vascular cerebral e outras doenças relacionadas (JEYASEELAN; LIM; ARMUGAM, 2008). Alguns dos miRNAs podem apresentar alterações no seu padrão de expressão tanto no cérebro quanto no sangue após a lesão cerebral (LIU et al., 2010).

O microRNAome cerebral sofre uma extensa alteração temporal após a isquemia focal transitória em ratos. Posteriormente, muitas transcrições e traduções do mRNA no cérebro pós isquêmico são regulados pelos miRNAs com alterados níveis de expressão (DHARAP et al., 2009). Os níveis de expressão de miRNA também são alteradas em astrócitos e neurônios após lesão isquêmica cerebral. Diferentes miRNAs têm especificamente padrões de expressão temporal em astrócitos e neurônios (ZIU et al., 2011).

No sistema nervoso central, as células responsáveis pela produção de mielina são os oligodendrócitos (OLs), que são sensíveis a lesão isquêmica e sua morte leva a perda da bainha de mielina comprometendo a função neurológica (ZHANG et al., 2009; MCLVER et al., 2010; CHIDA et al., 2011). Em diversos estudos realizados em modelos de rato com acidente vascular cerebral, o crescimento do axônio e a mielinização na área adjacente à área isquêmica, evidenciaram melhora dos resultados funcionais, que neste caso, podem ser estimulados com terapias que promovem a proliferação de células precursoras de oligodendrócitos (CPOs) (LIU et al., 2010; ZHANG et al., 2010; UENO et al., 2012).

Neste princípio, o miRNA-9 é um dos responsáveis pela regulação do fator de resposta do soro (FRS) in vitro, que ativa diretamente mais de 200 genes, incluindo a actina e ainda tem sido implicado no crescimento saliente (excrecência) do axônio (KNOLL et al., 2006; BULLER et al., 2012). O FRS é ativado em resposta à isquemia de OLs e de CPOs e sua expressão nos neurônios estimula as CPOs a se diferenciarem em OLs (STRITT et al., 2009; BULLER et al., 2012), o que indica que o miRNA-9 pode estar envolvido na regulação do FRS mediante um processo isquêmico.

O miRNA-9 é expresso em todos os tipos de células do sistema nervoso central e altamente expresso nos OLs, e tem especificamente demonstrado apresentar baixa regulação durante a diferenciação das CPOs em OLs (SMIRNOVA et al., 2005, LAU et al., 2008).

Em nosso estudo, a expressão do miRNA-9 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, entretanto pode-se observar que os grupos A, I e AI apresentaram menor expressão quando comparados ao grupo C.

Nossos dados corroboram com os estudos de Sathyan, Golden e Miranda (2007), que demonstraram que altas doses (320mg/dl) de etanol suprimem a expressão de miRNAs específicos durante a neurogênese cortical (miRNA-21, miRNA-335, miRNA-9 e miRNA 153).

Não foram encontrados dados na literatura relacionados ao miRNA-9 onde houvesse a associação do mecanismo de I/R associado ao uso crônico de álcool, entretanto, nossos resultados sugerem que a associação desses dois fatores não proporcionou alteração significativa na expressão do miRNA-9.

Alguns estudos têm utilizado o perfil de expressão gênica para identificar diferentes genes expressos no cérebro de alcólatras de longo prazo *post-mortem* (FLATSCHER-BADER et al, 2005; IWAMOTO et al, 2004; LEWOHL et al, 2000; LIU et al., 2004; LIU et al., 2006; MAYFIELD et al, 2002; SOKOLOV et al., 2003).

Em estudo de Miranda e colaboradores, foram investigados 27 casos individuais (14 alcoólicos bem caracterizados e 13 controles pareados) e foi descoberto que o abuso de etanol a longo prazo alterou a expressão de um número de famílias de genes relacionados funcionalmente incluindo a mielinização, a ubiquitinação, a apoptose, a adesão celular, a neurogênese, e a doença neuronal. Foram identificados padrões de expressão gênica que discriminaram com precisão o controle e os casos alcoólicos, sugerindo que o abuso de etanol reprograma a transcrição de genes de formas específicas e potencialmente previsíveis (LIU et al., 2006). Dessa forma, pode-se especular que os genes que são importantes na distinção dos grupos controle dos alcoólicos estão sob o controle de elementos reguladores, tais como os miRNAs (MIRANDA et al., 2010).

Notavelmente, etanol altera a expressão de uma ampla variedade de microRNAs que podem regular complicações ou disfunções induzidas pelo álcool (NATARAJAN; PACHUNKA; MOTT, 2015). O alcoolismo é uma doença multigênica, em que grandes redes de genes são afetados. Considerando efeito generalizado de miRNA-9 na expressão de vários genes relevantes para ações de etanol sobre o SNC, é tentador especular que miRNA-9 desempenha um papel substancial na mediação de efeitos do etanol sobre o desenvolvimento do alcoolismo (GRIFFITHS-JONES et al., 2008).

A expressão dos miRNAs provavelmente sofre alterações dinâmicas após trauma cerebral (RUAN et al., 2011). Após isquemia cerebral, a expressão de miRNA relacionados com a neurogênese, tais como miRNA-9, é, evidentemente, regulada positivamente (FIORE; SIEGEL; SCHRATT, 2008; SCHRATT et al., 2006). A expressão de miRNA-9 em pacientes com doença de Alzheimer ou doença de Huntington também está aparentemente desordenada (IMPEY et al., 2010; OTAEGUI et al., 2009). Foi demonstrado que o miRNA-9 desempenha um papel crucial na reparação da bainha de mielina após dano cerebral hipóxico-isquêmico (SHIN et al., 2009; ZHAO et al., 2010; LEHOTZKY et al., 2020; BUDDE et al., 2010; LAU et al., 2008; DEO et al., 2006; LEUCHT et al., 2008).

Um estudo recente demonstrou que miRNA-9 e Olig1 (oligodendrócito de linhagem gene 1) teve um efeito fundamental sobre a lesão cerebral e mielinização, e miRNA-9 regula a diferenciação de células progenitoras de oligodendrócito através da regulação do factor de resposta do soro (BULLER et al., 2012). O miRNA-9 também desempenhou um papel importante na manutenção da mielinogênese (LI; YAO, 2012). Outros estudos como de Stritt et al. (2009), Buller et al. (2012), Smirnova et al. (2005) e Lau et al. (2008), demonstraram que o miRNA-9 está relacionado com o processo de isquemia, apresentando ainda uma baixa regulação.

Correlacionando ainda a expressão do miRNA-9 com a expressão proteica de PARP-1 e AIF podemos sugerir que outros miRNAs possam estar envolvidos na regulação desta proteínas em modelo isquemia cerebral e alcoolismo isolados ou associados.

A correlação do miRNA-9 com os mecanismos de apoptose celular foi demonstrada nos estudos de Roccaro et al. (2010), onde os mesmos evidenciaram um aumento na regulação da fase sub G1 do ciclo celular em células transfectadas com pré-miRNA-9, quando comparadas com o controle, indicando a presença de apoptose em células com macroglobulinemia de Waldenström. Essa modulação da apoptose dependente do miRNA-9 foi associada a presença de PARP, caspase-8 e a clivagem da caspase-9 em células transfectadas com o miRNA-9 em comparação com células não transfectadas (ROCCARO et al., 2010).

Apesar de serem relativamente poucos em número, estes miRNAs são previstos para controlar a transcrição de uma uma grande proporção de tecidos e células específicas (KREK et al, 2005; LIM et al., 2005), regulando assim mecanismos biológicos importantes, incluindo a mitose, diferenciação celular, apoptose e proliferação celular (CROCE; CALIN, 2005; HE; HANNON, 2004).

Além disso, os mecanismos de direcionamento epigenéticos podem desenvolver novas abordagens terapêuticas para isquemia cerebral (YILMAZ et al., 2010). Os miRNAs apresentam um suposto papel chave na regulação da expressão do gene. Portanto, a sua potencialidade no diagnóstico de transtorno, tratamento e prognóstico está sendo ativamente procurada. Os miRNAs no sangue circulante e os seus perfis de expressão podem ser identificadas como biomarcadores fiáveis para o diagnóstico de acidente vascular cerebral isquêmico, terapia e prognóstico (TAN et al., 2009).

A investigação sobre os papéis dos mecanismos epigenéticos em isquemia cerebral está em crescimento exponencial. Abordagens epigenéticas são potenciais biomarcadores sensíveis e específicos para acidente vascular cerebral isquêmico e também são muito promissores na terapia de isquemia cerebral. Estas novas estratégias de regulação epigenética para reprogramação de células neurais e tecidos específicos são muito susceptíveis de promover mais efetivamente respostas de regeneração neuronal e neuroprotetora mais eficazes para a isquemia cerebral (ZHIPPING et al., 2016).

O diagnóstico precoce e o tratamento de doenças complexas como o alcoolismo, podem se beneficiar dos estudos de miRNAs, designados para identificar marcadores moleculares específicos às doenças, que fornecem uma impressão digital da condição; ou para identificar potenciais alvos terapêuticos. Os rápidos avanços no campo da genômica oferecem novos diagnósticos e potenciais para triagem até mesmo para doenças como o alcoolismo (MIRANDA et al., 2010)

Este estudo nos permitiu avaliar a expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de apoptose (AIF e PARP-1) no cérebro de ratos submetidos à isquemia cerebral associado ao alcoolismo crônico e ainda a expressão do miRNA-9 correlacionado à essas proteínas. No entanto, mais estudos se fazem necessários a fim de se estabelecer correlações mais detalhadas a respeito do miRNA-9 e de AIF e PARP-1, visto que os dados na literatura ainda são escassos.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Através deste estudo em animais submetidos à isquemia cerebral focal por oclusão da ACM por 90 minutos, seguida de reperfusão de 48 horas, associado à modelo de alcoolismo crônico, pode-se concluir que:

- A expressão proteica de PARP-1 apresentou-se diminuída em todas as áreas cerebrais analisadas no grupo isquêmico associado ao alcoolismo.
- A expressão proteica de AIF apresentou-se aumentada no grupo isquêmico associado ao alcoolismo em todas as áreas cerebrais estudadas.
- Não foi observada correlação entre a expressão do miRNA-9 com a expressão proteica de PARP-1 e AIF.

Referências

REFERÊNCIAS¹

ABAS, F.; ALKAN, T.; GOREN, B.; TASKAPILIOGLU, O.; SARANDOL, E.; TOLUNAY, S. Neuroprotective effects of postconditioning on lipid peroxidation and apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Turk Neurosurg**, v. 20, p. 1-8, 2010.

ADEOYE, O.; HORNING, R.; KHATRI, P.; KLEINDORFER, D. Recombinant tissue-type plasminogen activator use for ischemic stroke in the United States: a doubling of treatment rates over the course of 5 years. **Stroke**, v. 42, p. 1952–1955, 2011.

ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, v. 36, n. 2, p. 165-79, 2001.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, 431, n. 7006, p. 350–355, 2004.

ANDRABI, S. A.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Mitochondria and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders: **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1147, p. 233–241, 2008.

ANDRABI, S. A.; KIM, N. S.; YU, S-W.; WANG, H. KOH, D. W.; SASAKI, M.; KLAUS, J. A.; OTSUKA, T.; ZHANG, Z.; KOEHLER, R. C.; HURN, P. D.; POIRIER, G. G.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. **PNAS**, v. 103, n. 48, November 2006.

ASTRUP, J.; SIESJÖ, B. K.; SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. **Stroke**, v. 12, n. 6, p. 723–725, 1981.

ATALLAH, A.; FUSTINONI, O.; BEIGELMAN, R. **High prevalence of hemorrhagic stroke and untreated hypertension, frequent blood pressure lowering and inappropriate use of aspirin in the first Argentina National Stroke Registry (ARENAS)**. Abstract presented to: 5th World Stroke Congress; Vancouver, Canada, June 23-26, 2004.

BA, X.H.; CAI, L.P.; HAN, W. Effect of cilostazol pretreatment on the PARP/AIF-mediated apoptotic pathway in rat cerebral ischemia-reperfusion models. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, n. 5, p. 1209-1214, 2014.

¹ Sistema adotado nas Referências: ABNT NR6023

BABOR, T. F. Linking science to policy. The role of international collaborative research. **Alc Res Health**. v. 26, n. 1, p. 66-74, 2002.

BABOR, T.; HIGGINS-BIDDLE, J. C. **Intervenções breves: para o uso de risco e nocivo de álcool** - manual para uso em atenção primária. Ribeirão Preto: PAI-PAD; 2003.

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

BERGER, K.; AJANI, U. A.; KASE, C. S.; et al. Light-to-moderate alcohol consumption and risk of stroke among U.S. male physicians. **N Engl J Med.**, v. 341, n. 21, p. 1557-1554, 1999.

BERGER, M.; WAGNER, T. H.; BAKER, L. C. Internet use and stigmatized illness. **Soc Sci Med**. v. 61, p. 1821-7, 2005.

BOGOUSSLAVSKY, J.; VAN MELLE, G.; REGLI, F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. **Stroke**, v. 19, p. 1083–1092, 1988.

BRYSON, C. L.; MUKAMAL, K. J.; MITTLEMAN, M. A.; FRIED, L. P.; HIRSCH, C. H.; KITZMAN, D. W.; SISCOVICK, D. S. The association of alcohol consumption and incident heart failure: the Cardiovascular Health Study. **J Am Coll Cardiol.**, v. 48, p. 305-311, 2006.

BUDDE, H.; SCHMITT, S.; FITZNER, D.; OPITZ, L.; SALINAS-RIESTER, G.; SIMONS, M. Control of oligodendroglial cell number by the miR-17-92 cluster. **Development.**, v. 137, n. 13, p. 2127-2132, 2010.

BULLER, B.; CHOPP, M.; UENO, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, R.L.; MORRIS, D.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.G. Regulation of serum response factor by miRNA-200 and miRNA-9 modulates oligodendrocyte progenitor cell differentiation. **Glia**, v. 60, n. 12, p. 1906–1914, 2012.

CARLEN, P.L.; MCANDREWS, M.P.; WEISS, R.T.; DONGIER, M.; HILL, J.M.; MENZANO, E.; FARCNIK, K.; ABARBANEL, J.; EASTWOOD, M.R. Alcohol-related dementia in the institutionalized elderly. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 18, n. 6, p. 1330–1334, 1994.

CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. **II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país**. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD); 2007.

CASTRI, P.; LEE, Y.J.; PONZIO, T.; MARIC, D.; SPATZ, M.; BEMBRY, J.; HALLENBECK, J. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and its cleavage products differentially modulate cellular protection through NF-kappaB-dependent signaling. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 3, p. 640-51, 2014.

CHERIAN, P.P.; SCHENKER, S.; HENDERSON, G.I. Ethanol-mediated DNA damage and PARP-1 apoptotic responses in cultured fetal cortical neurons. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 32, n. 11, p. 1884-92, 2008.

CHEUNG, E.C.; JOZA, N.; STEENAART, N.A.; MCCLELLAN, K.A.; NEUSPIEL, M.; MCNAMARA, S.; MACLAURIN, J.G.; RIPPSTEIN, P.; PARK, D.S.; SHORE, G.C.; MCBRIDE, H.M.; PENNINGER, J.M.; SLACK, R.S. Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. **EMBO J.**, v. 25, n. 17, p. 4061–4073, 2006.

CHIARUGI, A. Poly(ADP-ribosyl)ation and stroke. **Pharmacol. Res.**, v. 52, n. 1, p. 15–24, 2005.

CHIDA, Y.; KOKUBO, Y.; SATO, S.; KUGE, A.; TAKEMURA, S.; KONDO, R.; KAYAMA, T. The alterations of oligodendrocyte, myelin in corpus callosum, and cognitive dysfunction following chronic cerebral ischemia in rats. **Brain Res.**, v. 1414, p. 22–31, 2011.

COLLINS, M.A.; NEAFSEY, E.J. Ethanol and adult CNS neurodamage: oxidative stress, but possibly not excitotoxicity. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 1358–1367, 2012.

COOLEN, M.; KATZ, S.; BALLY-CUIF, L. miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 220, 2013.

COOLEN, M.; THIEFFRY, D.; DRIVENES, Ø.; BECKER, T.S.; BALLY-CUIF, L. miR-9 Controls the Timing of Neurogenesis through the Direct Inhibition of Antagonistic Factors. **Developmental Cell**, v. 22, n. 5, p. 1052–1064, 2012.

COSTANZO, S.; DI CASTELNUOVO, A.; DONATI, M. B. *et al.* Cardiovascular and overall mortality risk in relation to alcohol consumption in patients with cardiovascular disease. **Circulation**. v. 121, p. 1951–9, 2010.

CROCE, C.M.; CALIN, G.A. miRNAs, cancer, and stem cell division. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 6–7, 2005.

CROME, O.; DOEPPNER, T.R.; SCHWARTING, S.; MÜLLER, B.; BÄHR, M.; WEISE, J. Enhanced poly(ADP-Ribose) polymerase-1 activation contributes to recombinant tissue plasminogen activator-induced aggravation of ischemic brain injury in vivo. **J. Neurosci. Res.**, v. 85, n. 8, p. 1734–1743, 2007.

CRONIN, C.A. Intravenous tissue plasminogen activator for stroke: a review of the ECASS III results in relation to prior clinical trials. **J. Emerg. Med.**, v. 38, n. 1, p. 99–105, 2010.

DAVID, K.K.; ANDRABI, S.A.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Parthanatos, a messenger of death. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 1116–1128, 2009.

DE MURCIA, G.; SCHREIBER, V.; MOLINETE, M.; SAULIER, B.; POCH, O.; MASSON, M.; NIEDERGANG, C.; MENISSIER DE MURCIA, J. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. **Mol Cell Biochem.**, v. 138, p. 15–24, 1994.

DEL ZOPPO, G. J.; MABUCHI, T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 23, n. 8, p. 879–894, 2003.

DEO, M.; YU, J.Y.; CHUNG, K.H.; TIPPENS, M.; TURNER, D.L. Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. **Dev Dyn.**, v. 235, n. 9, p. 2538–2548, 2006.

DEREX, L.; NIGHOGHOSSIAN, N. Intracerebral haemorrhage after thrombolysis for acute ischaemic stroke: an update. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 79, n. 10, p. 1093–1099, 2008.

DEZENA, R. A. **Neuroproteção hipotérmica pré, intra e pós-isquêmica na isquemia cerebral focal temporária em ratos**: análise morfométrica. 2011. 101 fl. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.

DHARAP, A.; BOWEN, K.; PLACE, R.; LI, L.C.; VEMUGANTI, R. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 29, n. 4, p. 675–687, 2009.

DI CASTELNUOVO, A.; COSTANZO, S.; BAGNARDI, V. *et al.* Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies. **Arch Intern Med.** v. 166, p. 2437–45, 2006.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.**, v. 22, n. 9, p. 391–397, 1999.

DONNAN, G. A.; FISHER, M.; MACLEOD, M.; DAVIS, S. M. Stroke. **Lancet**, v. 371, p. 1612–1623, 2008.

ECKARDT, M.J.; MARTIN, P.R. Clinical assessment of cognition in alcoholism. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 10, n. 2, p. 123–127, 1986.

ELLIS, H. M.; HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell**, v. 44, p. 817–829, 1986.

FEIGIN, V. L.; FINDLAY, M. Advances in subarachnoid hemorrhage. **Stroke**, v. 37, p. 305–308, 2006.

FILIPOWICZ, W.; JASKIEWICZ, L.; KOLB, F. A.; PILLAI, R. S. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 15, n. 3, p. 331–341, 2005.

FIORE, R.; SIEGEL, G.; SCHRATT, G. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1779, n. 8, p. 471–478, 2008.

FLATSCHER-BADER, T.; VAN DER BRUG, M.; HWANG, J. W.; GOCHEE, P. A.; MATSUMOTO, I.; NIWA, S.; WILCE, P. A. Alcohol-responsive genes in the frontal cortex and nucleus accumbens of human alcoholics. **J Neurochem.**, v. 93, n. 2, p. 359–70, 2005.

FONAROW, G.C. *et al.* Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. **Circulation**, v. 123, p. 750–758, 2011.

FORTNEY, J.; MUKHERJEE, S.; CURRAN, G.; FORTNEY, S.; HAN, X.; BOOTH, B. M. Factors associated with perceived stigma for alcohol use and treatment among at-risk drinkers. **Behav Health Serv Res.** v. 31, n. 4, p. 418–29, 2005.

FREIBERG, M. S.; SAMET, J. H. Alcohol and coronary heart disease. **Circulation**, v. 112, p. 1379–81, 2005.

FU, P.; PENG, C.; DING, J.Y.; ASMARO, K.; SULLIVAN, J.M.; GUTHIKONDA, M.; DING, Y. Acute administration of ethanol reduces apoptosis following ischemic stroke in rats. **Neuroscience Research**, v. 76, n. 1–2, p. 93–97, 2013.

GALDURÓZ, J. C. F., *et al.* **V levantamento sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio nas 27 capitais brasileiras.** Brasília: SENAD; 2005

GERACE, E.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; MORONI, F.; MANNAIONI, G. Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1 (PARP-1) Activation and Ca²⁺ Permeable α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid (AMPA) Channels in Post-Ischemic Brain Damage: New Therapeutic Opportunities? **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 5, p. 636-646, 2015.

GIGLIOTTI, A.; BESSA, M. A. Síndrome de dependência do álcool: critérios diagnósticos. **Rev Bras Psiq.** v. 22, n. 1, p. 31-7, 2004.

GINSBERG, M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 363–389, 2008.

GOLDSTEIN, L. B.; ROTHWELL, P. M. Advances in prevention and health services delivery. **Stroke**, v. 39, p. 258–260, 2008.

GREEN, D. R.; VICTOR, B. The pantheon of the fallen: why are there so many forms of cell death? **Trends Cell Biology**, v. 22, n. 11, p. 555-556, 2012.

GRIFFITHS-JONES, S.; GROCOCK, R. J.; VAN DONGEN, S.; BATEMAN, A.; ENRIGHT, A. J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. D140-4, 2006.

GUÉGAN, C. et al. Apoptotic death in cortical neurons of mice subjected to focal ischemia. **C. R. Acad. Sci. III**, v. 319, p. 879–885, 1996.

GUO, F.; HAN, X.; ZHANG, J.; ZHAO, X.; LOU, J.; CHEN, H.; HUANG, X. Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation via the regulation of MiR-25 in a rat model of focal cerebral ischemia. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109267, 2014.

GUPTA, S.; WARNER, J. Alcohol-related dementia: a 21st-century silent epidemic? **British Journal of Psychiatry**, v. 193, n. 5, p. 351–353, 2008.

HACHIMI-IDRISSI, S.; VAN HEMELRIJCK, A.; MICHOTTE, A.; SMOLDERS, I.; SARRE, S.; EBINGER, G.; HUYGHENS, L. & MICHOTTE, Y. Postischemic mild hypothermia reduces neurotransmitter release and astroglial cell proliferation during reperfusion after asphyxial cardiac arrest in rats. **Brain Res.**, v. 1019, p. 217-25, 2004.

HACKE, W. et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, p. 1317–1329, 2008.

HACKE, W.; DONNAN, G.; FIESCHI, C.; KASTE, M.; VON KUMMER, R.; BRODERICK, J.P.; BROTT, T.; FRANKEL, M.; GROTTA, J.C.; HALEY, E.C. JR.; KWIATKOWSKI, T.; LEVINE, S.R.; LEWANDOWSKI, C.; LU, M.; LYDEN, P.; MARLER, J.R.; PATEL, S.; TILLEY, B.C.; ALBERS, G.; BLUHMKI, E.; WILHELM, M.; HAMILTON, S. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. **Lancet**, v. 363, n. 9411, p. 768–774, 2004.

HACKE, W.; KASTE, M.; BLUHMKI, E.; BROZMAN, M.; DÁVALOS, A.; GUIDETTI, D.; LARRUE, V.; LEES, K.R.; MEDEGHRI, Z.; MACHNIG, T.; SCHNEIDER, D.; VON KUMMER, R.; WAHLGREN, N.; TONI, D. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 13, p. 1317–1329, 2008.

HAMBY, A.M.; SUH, S.W.; KAUPPINEN, T.M.; SWANSON, R.A. Use of a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor to suppress inflammation and neuronal death after cerebral ischemia-reperfusion. **Stroke**, v. 38, n. 2 suppl, p. 632-6, 2007.

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. **Nat Cell Biol.**, v. 2, p. E65–E67 2000.

HASSA, P. O.; HAENNI, S. S.; ELSER, M.; HOTTIGER, M. O. Nuclear ADPRibosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 70, p. 789-829, 2006.

HASSA, P. O.; HOTTIGER, M. O. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. **Cell Mol Life Sci.**, v. 59, n. 9, p. 1534–1553, 2002.

HAUCK, L.; HANSMANN, G.; DIETZ, R.; VON HARSDORF, R. Inhibition of hypoxia-induced apoptosis by modulation of retinoblastoma protein-dependent signaling in cardiomyocytes. **Circ Res.** v. 91, p. 782-789, 2002.

HE, L.; HANNON, G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet.**, v. 5, n. 7, p. 522-531, 2004.

HEERES, J.T.; HERGENROTHER, P.J. Poly(ADP-ribose) makes a date with death. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 6, p. 644–653, 2007.

HENGARTNER, M. O.; ELLIS, R. E.; HORVITZ, H. R. Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. **Nature**, v. 356, p. 494-9, 1992.

HU, G.; WU, Z.; YANG, F.; ZHAO, H.; LIU, X.; DENG, Y.; SHI, M.; ZHAO, G. Ginsenoside Rb blocks AIF mitochondrio-nuclear translocation and NF-κB nuclear accumulation by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1 after focal cerebral ischemia in rats. **Neurol.Sci.**, v. 34, p. 2101–2106, 2013.

HU, Z.; ZHONG, B.; TAN, J.; CHEN, C.; LEI, Q.; ZENG, L. The Emerging Role of Epigenetics in Cerebral Ischemia. **Mol Neurobiol.**, 2016. [Epub ahead of print].

HUANG, W.; LIU, X.; CAO, J.; MENG, F.; LI, M.; CHEN, B.; ZHANG, J. miR-134 regulates ischemia/reperfusion injury-induced neuronal cell death by regulating CREB signaling. **J Mol Neurosci**, v. 55, n. 4, p. 821–829, 2015.

IADECOLA, C.; GOLDMAN, S. S.; HARDER, D. R.; HEISTAD, D. D.; KATUSIC, Z. S.; MOSKOWITZ, M. A.; SIMARD, J. M.; SLOAN, M. A.; TRAYSTMAN, R. J.; VELLETRI, P. A. Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cerebrovascular biology and disease. **Stroke**, v. 37, n. 6, p. 1578–1581, 2006.

IMPEY, S.; DAVARE, M.; LESIAK, A.; FORTIN, D.; ANDO, H.; VARLAMOVA, O.; OBRIETAN, K.; SODERLING, T.R.; GOODMAN, R.H.; WAYMAN, G.A. An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. **Mol Cell Neurosci.**, v. 43, n. 1, p. 146-156, 2010.

IRMA, LAONIGRO, MICHELE, CORREALE, MATTEO DI, BIASE, EMANUELE, ALTOMARE, Alcohol abuse and heart failure. **Eur. J. Hear. Fail.** v. 11, p. 453–462, 2009.

ISO, H.; BABA, S.; MANNAMI, T.; et al. Alcohol consumption and risk of stroke among middle-aged men: the JPHC Study Cohort I. **Stroke**, v. 35, n. 5, p. 1124-1129, 2004.

IWAMOTO, K.; BUNDO, M.; YAMAMOTO, M.; OZAWA, H.; SAITO, T.; KATO, T. Decreased expression of NEFH and PCP4/PEP19 in the prefrontal cortex of alcoholics. **Neurosci Res**, v. 49, n. 4, p. 379-85, 2004.

JAGTAP, P.; SZABO, C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 4, n. 5, p. 421-40, 2005.

JEYASEELAN, K.; LIM, K.Y.; ARMUGAM, A. MicroRNA expression. in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. **Stroke**, v. 39, n. 3, p. 959–966, 2008.

JUNG, J. E.; KIM, G. S.; CHEN, H.; MAIER, C. M.; NARASIMHAN, P.; SONG, Y. S. et al. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. **Mol Neurobiol.**, v. 41, p. 172-9, 2010.

KANG, Y.H.; YI, M.J.; KIM, M.J.; PARK, M.T.; BAE, S.; KANG, C.M.; CHO, C.K.; PARK, I.C.; PARK, M.J.; RHEE, C.H.; HONG, S.I.; CHUNG, H.Y.; LEE, Y.S.; LEE, S.J. Caspaseindependent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: Reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosisinducing factor release from mitochondria. **Cancer Res.**, v. 64, n. 24, p. 8960–8967, 2004.

KAUPPINEN, T.M.; SUH, S.W.; BERMAN, A.E.; HAMBY, A.M.; SWANSON, R.A. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase suppresses inflammation and promotes recovery after ischemic injury. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 29, n. 4, p. 820–829, 2009.

KIDNER, C. A.; MARTIENSSEN, R. A. The developmental role of microRNA in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 8, n. 1, p. 38–44, 2005.

KLATSKY, A. L.; ARMSTRONG, M. A.; FRIEDMAN, G. D.; SIDNEY, S. Alcohol drinking and risk of hospitalization for ischemic stroke. **Am J Cardiol.**, v. 88, n. 6, p. 703-706, 2001.

KLEINDORFER, D.; LINDSELL, C.J.; BRASS, L.; KOROSHETZ, W.; BRODERICK, J.P. National US estimates of recombinant tissue plasminogen activator use: ICD-9 codes substantially underestimate. **Stroke**, v. 39, p. 924–928, 2008.

KNOLL, B.; KRETZ, O.; FIEDLER, C.; ALBERTI, S.; SCHUTZ, G.; FROTSCHER, M.; NORDHEIM, A. Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. **Nat Neurosci.**, v. 9, n. 2, p. 195–204, 2006.

KOH, S.H.; CHANG, D.I.; KIM, H.T.; Kim, J.; Kim, M.H.; Kim, K.S.; Bae, I.; Kim, H.; Kim, D.W.; Kim, S.H. Effect of 3-aminobenzamide, PARP inhibitor, on matrix metalloproteinase-9 level in plasma and brain of ischemic stroke model. **Toxicology**, v. 214, n. 1-2, p. 131-9, 2005.

KOHYAMA, J.; KOJIMA, T.; TAKATSUKA, E.; YAMASHITA, T.; NAMIKI, J.; HSIEH, J.; GAGE, F.H.; NAMIHARA, M. et al. Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 46, p. 18012–18017, 2008.

KREK, A.; GRUN, D.; POY, M.N.; WOLF, R.; ROSENBERG, L.; EPSTEIN, E.J.; MACMENAMIN, P.; DA PIEDADE, I.; GUNSALUS, K.C.; STOFFEL, M.; RAJEWSKY, N. Combinatorial microRNA target predictions. **Nat Genet.**, v. 37, n. 5, p. 495–500, 2005.

LAPCHAK, P.A. Neuroprotective and neurotrophic curcuminoids to treat stroke: a translational perspective. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 20, n. 1, p. 13-22, 2011.

LARANJEIRA, R., et al. **I levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira**. Brasília: SENAD; 2007.

LAU, P.; VERRIER, J.D.; NIELSEN, J.A.; JOHNSON, K.R.; NOTTERPEK, L.; HUDSON, L.D. Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. **J Neurosci.**, v. 28, n. 45, p. 11720–11730, 2008.

LAU, P.; VERRIER, J.D.; NIELSEN, J.A.; JOHNSON, K.R.; NOTTERPEK, L.; HUDSON, L.D. Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. **J Neurosci.**, v. 28, n. 45, p. 11720–11730, 2008.

LEE, J.H.; KIM, K.Y.; LEE, Y.K.; PARK, S.Y.; KIM, C.D.; LEE, W.S.; RHIM, B.Y.; HONG, K.W. Cilostazol prevents focal cerebral ischemic injury by enhancing casein Kinase 2 phosphorylation and suppression of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation in rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 308, n. 3, p. 896–903, 2004.

LEHOTZKY, A.; LAU, P.; TOKÉSI, N.; MUJA, N.; HUDSON, L.D.; OVÁDI, J. Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25) is critical for oligodendrocyte differentiation. **Glia**, v. 58, n. 2, p. 157–168, 2010.

LEUCHT, C.; STIGLOHER, C.; WIZENMANN, A.; KLAFKE, R.; FOLCHERT, A.; BALLY-CUIF, L. MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. **Nat Neurosci.**, v. 11, n. 6, p. 641–648, 2008.

LEWOHL, J. M.; WANG, L.; MILES, M. F.; ZHANG, L.; DODD, P. R.; HARRIS, R. A. Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 24, n. 12, p.1873–82, 2000.

LI, J.S.; YAO, Z.X. MicroRNAs: novel regulators of oligodendrocyte differentiation and potential therapeutic targets in demyelination-related diseases. **Mol Neurobiol.**, v. 45, n. 1, p. 200–212, 2012.

LIM, L.P.; LAU, N.C.; GARRETT-ENGELE, P.; GRIMSON, A.; SCHELTER, J.M.; CASTLE, J.; BARTEL, D.P.; LINSLEY, P.S.; JOHNSON, J.M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 769 –773, 2005.

LIN, W.; AME, J. C.; ABOUL-ELA, N.; JACOBSON, E. L.; JACOBSON, M. K. Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine poly (ADP-ribose) glycohydrolase. **J Biol Chem.**, v. 272, n. 18, p. 11895–11901, 1997.

LIU J, LEWOHL JM, DODD PR, RANDALL PK, HARRIS RA, MAYFIELD RD. Gene expression profiling of individual cases reveals consistent transcriptional changes in alcoholic human brain. **J Neurochem.**, v. 90, n. 5, p. 1050-8, 2004.

LIU, D.Z.; TIAN, Y.; ANDER, B.P.; XU, H.; STAMOVA, B.S.; ZHAN, X.; TURNER, R.J.; JICKLING, G. et al. (2010) Brain and blood microRNA expression. profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 30, n. 1, p. 92–101, 2010.

LIU, J.; LEWOHL, J. M.; HARRIS, R. A.; IYER, V. R.; DODD, P. R.; RANDALL, P. K.; MAYFIELD, R. D. Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 7, p. 1574–82, 2006.

LIU, Y.; ZHANG, J.; HAN, R.; LIU, H.; SUN, D.; LIU, X. Downregulation of serum brain specific microRNA is associated with inflammation and infarct volume in acute ischemic stroke. **J Clin Neurosci**, v. 22, n. 2, p. 291–295, 2015.

LIU, Z.; LI, Y.; ZHANG, Z.G.; CUI, X.; CUI, Y.; LU, M.; SAVANT-BHONSALE, S.; CHOPP, M. Bone marrow stromal cells enhance inter- and intracortical axonal connections after ischemic stroke in adult rats. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 30, p. 1288–1295, 2010.

LO, E.H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 4, n. 5, p. 399–415, 2003.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. **J. Insect. Physiol.**, v. 10, p. 643–649, 1964.

LOPEZ, A. D.; MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; JAMISON, D. T.; MURRAY, C. J. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. **Lancet**, v. 367, p. 1747–57, 2006.

MANDEL, M.; TALAMONI, F. E.; BOR-SENG-SHU, E.; TEIXEIRA, M. J., CHADI, G. Neurogenic neuroprotection: clinical perspectives. **Funct. Neurol.**, v. 27, p. 207–216, 2012.

MATSUURA, S.; EGI, Y.; YUKI, S.; HORIKAWA, T.; SATOH, H.; AKIRA, T. MP-124, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor, ameliorates ischemic brain damage in a non-human primate model. **Brain Res.**, v. 1410, p. 122–131, 2011.

MATTSON, M. P.; DUAN, W.; PEDERSEN, W. A. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. **Apoptosis**, v. 6, p. 69–81, 2001

MAYFIELD, R. D.; LEWOHL, J. M.; DODD, P. R.; HERLIHY, A.; LIU, J.; HARRIS, R. A. Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. **J Neurochem**, v. 81, n. 4, p. 802–13, 2002.

MCIVER, S.R.; MUCCIGROSSO, M.; GONZALES, E.R.; LEE, J.M.; ROBERTS, M.S.; SANDS, M.S.; GOLDBERG, M.P. Oligodendrocyte degeneration and recovery after focal cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 169, n. 3, p. 1364–1375, 2010.

MEHTA, S L.; MANHAS, N.; RAGHUBIR, R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. **Brain Res. Rev**, v. 54, p. 34–66, 2007.

MELONI, J. N.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. **Rev Bras Psiqui**, v. 26, (Supl. 1), p. 7-10, 2004

MIRANDA, R. C.; PIETRZYKOWSKI, A. Z.; TANG, Y.; SATHYAN, P.; MAYFIELD, D.; KESHAVARZIAN, A.; SAMPSON, W.; HERELD, D. MicroRNAs: Master regulators of ethanol abuse and toxicity? **Alcohol Clin Exp Res**, v. 34, n. 4, p. 575-587, 2010.

MORKDAD, A. H.; MARKS, J. S.; STROUP, D. F.; GERBERDING, J. L. Actual causes of death in the United states. **JAMA**, v. 291, p. 1238-1245, 2004.

MORONI, F. Poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 8, n. 1, p. 96–103, 2008.

MORONI, F.; CHIARUGI, A. Post-ischemic brain damage: targeting PARP-1 within the ischemic neurovascular units as a realistic avenue to stroke treatment. **FEBS J.**, v. 276, n. 1, p. 36-45, 2009.

MOVVA, R.; FIGUEREDO, V. M. Alcohol and the heart: to abstain or not to abstain?. **Int J Cardiol.**, v. 164, p. 267-276, 2013.

MOZAFFARIAN, D.; BENJAMIN, E.J.; GO, A.S.; ARNETT, D.K.; BLAHA, M.J.; CUSHMAN, M. et al. Heart disease and stroke statistics–2015 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. e29–322, 2015.

MUIR, K. W. Stroke. **Medicine**, v. 37, n. 2, p. 109-114, 2008.

MUKAMAL, K. J. Alcohol use and prognosis in patients with coronary heart disease. **Prev Cardiol.** v. 6, p. 93–8, 2003.

MUKAMAL, K. J.; CONIGRAVE, K. M.; MITTLEMAN, M. A.; et al. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. **N Engl J Med.**, v. 348, p. 109-18, 2003.

MUKAMAL, K. J.; JENSEN, M. K.; GRØNBÆK, M.; et al. Drinking frequency, mediating biomarkers, and risk of myocardial infarction in women and men. **Circulation**, v. 112, p. 1406-13, 2005.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, p. 1436–42, 1997a.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, p. 1269–76, 1997b.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. **The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020.** Boston: Harvard University Press, 1996 apud WARLOW, C.; SUDLOW, C.; DENIS, M.; WARDLAW, J.; SANDERCOCK, P. **Stroke**. **Lancet**, v. 362, p. 1211-24, 2003.

NAGAYAMA, T.; SIMON, R.P.; CHEN, D.; HENSHALL, D.C.; PEI, W.; STETLER, R.A.; CHEN, J. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in the rat hippocampus may contribute to cellular recovery following sublethal transient global ischemia. **J. Neurochem.**, v. 74, n. 4, p. 1636–1645, 2000.

NATARAJAN, S. K.; PACHUNKA, J. M.; MOTT, J. L. Role of microRNAs in Alcohol-Induced Multi-Organ Injury. **Biomeolecules**, v. 5, n. 4, p. 3309-3338, 2015.

NICOLETTI, V. G.; STELLA, A. M. Role of PARP under stress conditions: cell death or protection? **Neurochem Res**, v. 28, n. 2, p. 187–194, 2003.

O'KEEFE, J. H.; BHATTI, S. K.; BAJWA, A.; DINICOLANTONIO, J. J.; LAVIE, C. J. Alcohol and cardiovascular health: the dose makes the poison...or the remedy. **Mayo Clin Proc**, v. 89, n. 3, p. 382-93, 2014.

O'COLLINS, V.E.; MACLEOD, M.R.; DONNAN, G.A.; HORKY, L.L.; VAN DER WORP, B.H.; HOWELLS, D.W. 1,026 Experimental treatments in acute stroke. **Ann Neurol.**, v. 59, n. 3, p. 467–477, 2006.

OLIVER, F. J.; MENISSIER-DE MURCIA, J.; DE MURCIA, G. Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease. **Am J Hum Genet**, v. 64, n. 5, p. 1282–1288, 1999.

OTAEGUI, D.; BARANZINI, S.E.; ARMAÑANZAS, R.; CALVO, B.; MUÑOZ-CULLA, M.; KHANKHANIAN, P.; INZA, I.; LOZANO, J.A.; CASTILLO-TRIVIÑO, T.; ASENSIO, A.; OLASKOAGA, J.; LÓPEZ DE MUNAIN, A. et al. Differential micro RNA expression in PBMC from Multiple sclerosis patients. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6309, 2009.

ÔUNPUU, S.; ANAND, S.; YUSUF, S. The impending global epidemic of cardiovascular diseases. **Eur Heart J**, v. 21, p. 880-3, 2000.

PADUANI, G. F.; BARBOSA, G. A.; MORAIS, J. C. R.; PEREIRA, J. C. P.; ALMEIDA, M. F.; PRADO, M. M., et al. Consumo de álcool e fumo entre os estudantes da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia. **Rev Bras Educ Méd.** v. 32, p. 66-75, 2008.

PAPAPOSTOULOU A, SPENGOS K, FYLAKTOU I, POULOU M, GOUNTAS I, KITSIOUTZELI S, KANAVAKIS E, TZETIS M. Are ALOX5AP gene SNPs a risk or protective factor for stroke? **Gene**, v. 548, n. 1, p. 56-60, 2014.

PEDROSA, A. A. da S.; CAMACHO, L. A. B.; PASSOS, S. R. L.; OLIVEIRA, R. de V. C. de. Consumo de álcool entre estudantes universitários. **Cad. Saúde Pública** [online]. v. 27, n.8, p. 1611-1621, 2011. ISSN 0102-311X.

PEREIRA, J. C.; BARRETO, S. M.; PASSOS, V. M. A. Perfil de risco cardiovascular e autoavaliação da saúde no Brasil: estudo de base populacional. **Rev Panam Salud Publica** [online]. v. 25, n. 6, p. 491-498, 2009. ISSN 1020-4989.

PIETRZYKOWSKI, A.Z.; FRIESEN, R.M.; MARTIN, G.E.; PUIG, S.I.; NOWAK, C.L.; WYNNE, P.M.; SIEGELMANN, H.T.; TREISTMAN, S.N. Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol. **Neuron.**, v. 59, n. 2, p. 274–287, 2008.

RECKELESS, I. P; BUCHAN, A. M. Stroke: management and prevention. **Medicine**, v. 36, n. 11, p. 592-600, 2008.

ROCCARO, A.M; SACCO, A.; JIA, X.; AZAB, A.K.; MAISO, P.; NGO, H.T.; AZAB, F.; RUNNELS, J.; QUANG, P.; GHOBRIAL, I.M. microRNA-dependent modulation of histone acetylation in Waldenstroöm Macroglobulinemia. **Blood**, v. 116, n. 9, p. 1506-14, 2010.

RODRIGUEZ-GARCIA, J. L.; BOTIA, E.; DE LA SIERRA, A.; VILLANUEVA, M. A.; GONZALEZ-SPINOLA, J. Significance of elevated blood pressure and its management on the short-term outcome of patients with acute ischemic stroke. **Am J Hypertens.**, v. 18, p. 379-84, 2005.

ROTHWELL, P. M. The high cost of not funding stroke research: a comparison with heart disease and cancer. **Lancet**, v.357, p. 1612–16, 2001

RUAN, Q.F.; PAN, C.F.; SHEN, X.L.; et al. Expression changes of microRNA in hippocampus of mouse after brain injury. **Zhonghua Shiyao Waikexue**, v. 28, n. 2, p. 151-152, 2011.

SACCO, R. L.; ELKIND, M.; BODEN-ALBALA, B.; et al. The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. **JAMA**. v. 281, n. 1, p. 53-60, 1999.

SALLMANN, F. R.; VODENICHAROV, M. D.; WANG, Z. Q.; POIRIER, G. G. Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP- 1 gene with poly (ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks. **J Biol Chem**, v. 275, p.15504-15511, 2000.

SAVITZ, S.I.; FISHER, M. Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials. **Ann. Neurol.**, v. 61, n. 5, p. 396–402, 2007.

SCHRATT, G.M.; TUEBING, F.; NIGH, E.A.; KANE, C.G.; SABATINI, M.E.; KIEBLER, M.; GREENBERG, M.E. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. **Nature**, v. 439, n. 7074, p. 283-289, 2006.

SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, v. 7, p. 253–266, 1973.

SELMAN, W. R.; LUST, W. D.; PUNDIK, S. Metabolic failure leads to the deterioration of the border zone in reversible focal ischemia. **Abstracts of Society for Neuroscience**, v. 18, n. 1579-1585, 1992.

SHALL, S.; DE MURCIA, G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? **Mutat Res.**, v. 460, n. 1, p. 1–15, 2000.

SHIBATA, M.; KUROKAWA, D.; NAKAO, H.; OHMURA, T.; AIZAWA, S. MicroRNA-9 modulates Cajal-Retzius cell differentiation by suppressing Foxg1 expression in mouse medial pallium. **J Neurosci.**, v. 28, n. 41, p. 10415–10421, 2008.

SHIN, D.; SHIN, J.Y.; MCMANUS, M.T.; PTÁČEK, L.J.; FU, Y.H. Dicer ablation in oligodendrocytes provokes neuronal impairment in mice. **Ann Neurol.**, v. 66, n. 6, p. 843-857, 2009.

SKOTZKO, C. E.; VRINCEANU, A.; RUEGER, L.; FREUDENBERGER, R. Alcohol use and congestive heart failure: incidence, importance, and approaches to improved history taking. **Heart Fail Rev.** v. 14, p. 51–55, 2009.

SMIRNOVA, L.; GRAFE, A.; SEILER, A.; SCHUMACHER, S.; NITSCH, R.; WULCZYN, F.G. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. **Eur J Neurosci.**, v. 21, n. 6, p. 1469–1477, 2005.

SMULSON, M. E.; SIMBULAN-ROSENTHAL, C. M.; BOULARES, A. H.; YAKOVLEV, A.; STOICA, B.; IYER, S.; LUO, R.; HADDAD, B.; WANG, Z. Q.; PANG, T.; JUNG, M.; DRITSCHILOA, A.; ROSENTHAL, D. S. Roles of poly(ADP-ribose) and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of p53 and E2F-1. **Adv Enzyme Regul.**, v. 40, n. 1, p. 183–215, 2000.

SOBRADO, M. et al. Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 118, n. 1, p. 107-113, 2003.

SOKOLOV, B. P.; JIANG, L.; TRIVEDI, N. S.; ASTON, C. Transcription profiling reveals mitochondrial, ubiquitin and signaling systems abnormalities in postmortem brains from subjects with a history of alcohol abuse or dependence. **J Neurosci Res.**, v. 72, n. 6, p. 756–67, 2003.

SONTHEIMER, E. J.; CARTHEW, R. W. Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 9–12, 2005.

SPOSATO LA, ESNAOLA MM, ZAMORA R, et al., for the ReNACer Investigators. Argentinian Neurological Society. Quality of ischemic stroke care in emerging countries: the Argentinian National Stroke Registry (ReNACer). **Stroke**, v. 39, p. 3036-41, 2008.

SRIRAM, C.S.; JANGRA, A.; BEZBARUAH, B.K.; K V A; SYKAM, S. Alternative mechanisms of inhibiting activity of poly (ADP-ribose) polymerase-1. **Frontiers in Bioscience, Scholar**, v. 8, p. 123-128, 2016.

SRIRAM, C.S.; JANGRA, A.; GURJAR, S.S.; HUSSAIN, M.I.; BORAH, P.; LAHKAR, M.; MOHAN, P.; BEZBARUAH, B.K. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 3-aminobenzamide pretreatment ameliorates lipopolysaccharide-induced neurobehavioral and neurochemical anomalies in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 133, p. 83-91, 2015.

SRIRAM, C.S.; JANGRA, A.; KASALA, E.R.; BODDULURU, L.N.; BEZBARUAH, B.K. Targeting poly(ADPribose) polymerase1 in neurological diseases: A promising trove for new pharmacological interventions to enter clinical translation. **Neurochem Int.**, v. 76, p. 70-81, 2014.

STRITT, C.; STERN, S.; HARTING, K.; MANKE, T.; SINSKE, D.; SCHWARZ, H.; VINGRON, M.; NORDHEIM, A.; KNOLL, B. Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression. **Nat Neurosci.**, v. 12, n. 4, p. 418–427, 2009.

SUNKESULA, S.R.B.; SWAIN, U.; BABU, P.P. Cell Death is Associated with Reduced Base Excision Repair During Chronic Alcohol Administration in Adult Rat Brain. **Neurochem Res.**, v. 33, n. 6, p. 1117–1128, 2008.

SZABO, C.; DAWSON, V. L. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia–reperfusion. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 19, n. 7, p. 287–298, 1998.

TAIT, S. W.; ICHIM, G.; GREEN, D. R. Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death. **J Cell Sci.**, v. 127, p. 2135–2144, 2014.

TAJUDDIN, N.F.; PRZYBYCIEN-SZYMANSKA, M.M.; PAK, T.R.; NEAFSEY, E.J.; COLLINS, M.A. Effect of repetitive daily ethanol intoxication on adult rat brain: Significant changes in phospholipase A2 enzyme levels in association with increased PARP-1 indicate neuroinflammatory pathway activation. **Alcohol**, v. 47, n. 1, p. 39–45, 2013.

TAJUDDIN, N.F.; PRZYBYCIEN-SZYMANSKA, M.M.; PAK, T.R.; NEAFSEY, E.J.; COLLINS, M.A. Effect of repetitive daily ethanol intoxication on adult rat brain: Significant changes in phospholipase A2 enzyme levels in association with increased PARP-1 indicate neuroinflammatory pathway activation. **Alcohol**, v. 47, n. 1, p. 39–45, 2013.

TAN, K.S.; ARMUGAM, A.; SEPRAMANIAM, S.; LIM, K.Y.; SETYOWATI, K.D.; WANG, C.W.; JEYASEELAN, K. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7689, 2009.

TAN, K.S.; ARMUGAM, A.; SEPRAMANIAM, S.; LIM, K.Y.; SETYOWATI, K.D.; WANG, C.W.; JEYASEELAN, K. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7689, 2009.

TIMOTHY, S. N.; DAVID, E. N.; ROBERT, D. B. The intensity of binge alcohol consumption amoug U.S. adults. **Am. J. Prev. Med.**, v. 38, p. 201-207, 2010.

UENO, Y.; CHOPP, M.; ZHANG, L.; BULLER, B.; LIU, Z.; LEHMAN, N.L.; LIU, X.S.; ZHANG, Y.; ROBERTS, C.; ZHANG, Z.G. Axonal Outgrowth and Dendritic Plasticity in the Cortical Peri-Infarct Area After Experimental Stroke. **Stroke**, v. 48, n. 8, p. 2221-8, 2012.

VALENCIA-SANCHEZ, M.A.; LIU, J.; HANNON, G. J.; PARKER, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes Dev.**, v. 20, p. 515–524, 2006.

VANDEN BERGHE, T.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, p. 135–147, 2014.

VIRAG, L.; SZABO, C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. **Pharmacol Rev.**, v. 54, n. 3, p. 375–429, 2002.

WANG, C.; PAN, Y. CHENG, B.; CHEN, J.; BAI, B. Identification of Conserved and Novel microRNAs in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury of Rat Using Deep Sequencing. **J Mol Neurosci**, v. 54, n. 4, p. 671-683, 2014.

WANG, C.P.; SHI, Y.W.; TANG, M.; ZHANG, X.C.; GU, Y.; LIANG, X.M.; WANG, Z.W.; DING, F. Isoquercetin Ameliorates Cerebral Impairment in Focal Ischemia Through Anti-Oxidative, Anti-Inflammatory, and Anti-Apoptotic Effects in Primary Culture of Rat Hippocampal Neurons and Hippocampal CA1 Region of Rats. **Mol Neurobiol**. 2016 Feb 29. [Epub ahead of print].

WANG, Y. R.; MAO, H. F.; CHEN, J. Q. Effects of huwentoxin on tumor necrosis factor apoptotic pathway in the hippocampus of a rat model of cerebral ischemia. **Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.**, v. 18, p. 5813-5818, 2014.

WARLOW, C. P.; DENNIS, M. S.; VAN, G. I. J. N. J.; *et al.* What caused this transiente or persisting ischaemic event? In: *Stroke: a practical guide to management*. Oxford: Blackwell Science, 2001: 223–300 apud WARLOW, C.; SUDLOW, C.; DENIS, M.; WARDLAW, J.; SANDERCOCK, P. **Stroke**. Lancet, v. 362, p. 1211-24, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Status Report on Alcohol**. Geneva: World Health Organization; 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Status Report on Alcohol**. Geneva: World Health Organization; 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2002-Reducing risks, promoting health life**. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/media_centre/en/index.html>.

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.

XUE, Q.; LIU, Y.; QI, H.; MA, Q.; XU, L.; CHEN, W.; CHEN, G.; XU, X. A novel brain neurovascular unit model with neurons, astrocytes and microvascular endothelial cells of rat. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 9, n. 2, p. 174–189, 2013.

YANG, D.; GUO, S.; ZHANG, T.; LI, H. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 2500-2506, 2009.

YILMAZ, G.; ALEXANDER, J.S.; ERKURAN YILMAZ, C.; GRANGER, D.N. Induction of neuro-protective/regenerative genes in stem cells infiltrating post-ischemic brain tissue. **Experimental & translational stroke medicine**, v. 2, n. 1, p. 11, 2010.

YU, Q.; LU, Z.; TAO, L.; YANG, L.; GUO, Y.; YANG, Y.; SUN, X.; DING, Q. ROS-Dependent Neuroprotective Effects of NaHS in Ischemia Brain Injury Involves the PARP/AIF Pathway. **Cell Physiol Biochem.**, v. 36, n. 4, p. 1539-1551, 2015.

YU, S. W.; WANG, H.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. **Neurobiol Dis.**, v. 14, n. 3, p. 303–317, 2003.

YU, S.W.; ANDRABI, S.A.; WANG, H.; KIM, N.S.; POIRIER, G.G.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADPribose) (PAR) polymer-induced cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 48, p. 18314-18319, 2006.

YU, S.W.; WANG, H.; POITRAS, M.F.; COOMBS, C.; BOWERS, W.J.; FEDEROFF, H.J.; POIRIER, G.G.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1–dependente cell death by apoptosis-inducing factor. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 259–263, 2002.

YUAN, Y.; PENG, C.; LI, K.; HUSSAIN, M.; SIKHARAM, C.; GUTHIKONDA, M.; DING, Y. Ethanol reduces expression of apoptotic proteins after hypoxia/reoxygenation in a brain slice model. **Neurol Res.**, v. 34, n. 4, p. 373-8, 2012.

ZASLOW, M. J.; TAKANISHI, R. Priorities for research on adolescent development. **Am Psychol.** v. 48, p. 185-92, 1993.

ZHANG, J.; LI, Y.; ZHANG, Z.G.; LU, M.; BORNEMAN, J.; BULLER, B.; SAVANT-BHONSALE, S.; ELIAS, S.B.; CHOPP, M. Bone marrow stromal cells increase oligodendrogenesis after stroke. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 29, n. 6, p. 1166–1174, 2009.

ZHANG, L.; CHOPP, M.; ZHANG, R.L.; WANG, L.; ZHANG, J.; WANG, Y.; TOH, Y.; SANTRA, M.; LU, M.; ZHANG, Z.G. Erythropoietin amplifies stroke-induced oligodendrogenesis in the rat. **PLoS One.**, v. 5, n. 6, p. e11016, 2010.

ZHANG, R.; TANG, S.; HUANG, W.; LIU, X.; LI, G.; CHI, H.; ZHU, M.; TANG, J. Protection of the brain following cerebral ischemia through the attenuation of PARP-1-induced neurovascular unit damage in rats. **Brain Research**, v. 1624, p. 9–18, 2015.

ZHAO, C.; SUN, G.; LI, S.; SHI, Y. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 16, n. 4, p. 365–371, 2009.

ZHAO, H.; SAPOLSKY, R. M.; STEINBERG, G. K. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: Ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 26, n. 9, p. 1114- 1121, 2006.

ZHAO, X.; HE, X.; HAN, X.; YU, Y.; YE, F.; CHEN, Y.; HOANG, T.; XU, X.; MI, Q.S.; XIN, M.; WANG, F.; APPEL, B.; LU, Q.R. microRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. **Neuron.**, v. 65, n. 5, p. 612-626, 2010.

ZHAO, Y.; PAN, R.; LI, S.; LUO, Y.; YAN, F.; YIN, J.; QI, Z.; YAN, Y.; JI, X.; LIU, K.J. Chelating intracellularly accumulated zinc decreased ischemic brain injury through reducing neuronal apoptotic death. **Stroke**, v. 45, n. 4, p. 1139–1147, 2014.

ZIU, M.; FLETCHER, L.; RANA, S.; JIMENEZ, D.F.; DIGICAYLIOGLU, M. Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e14724, 2011.