



Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

2015

**Acidente vascular encefálico isquêmico na  
exposição crônica ao etanol: estudo pré-clínico  
da comorbidade e da resposta a minociclina.**

Enéas de Andrade Fontes Júnior

ENÉAS DE ANDRADE FONTES JÚNIOR

Acidente vascular encefálico isquêmico na exposição crônica ao  
etanol: estudo pré-clínico da comorbidade e da resposta a  
minociclina.

Tese de doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia  
Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal do Pará – UFPA.

Orientadora: Dra. María Elena Crespo López

Co-orientadora: Dra. Cristiane do Socorro  
Ferraz Maia

Belém – 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Fontes Júnior, Enéas de Andrade, 1981-  
Acidente vascular encefálico isquêmico na exposição  
crônica ao etanol: estudo pré-clínico da comorbidade e  
da resposta a minociclina / Enéas de Andrade Fontes  
Júnior. - 2015.

Orientadora: Maria Elena Crespo-López;  
Coorientadora: Cristiane do Socorro Ferraz  
Maia.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do  
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa  
de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia  
Celular, Belém, 2015.

1. Acidente vascular cerebral. 2. Álcool  
Efeito fisiológico. 3. Isquemia. 4. Stress  
oxidativo. 5. Minociclina. I. Título.

CDD 22. ed. 616.81

---

## ENÉAS DE ANDRADE FONTES JÚNIOR

### Acidente vascular encefálico isquêmico na exposição crônica ao etanol: estudo pré-clínico da comorbidade e da resposta a minociclina.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará – UFPA.

Data: 27 de fevereiro de 2015

#### **Orientação:**

Profa. Dra. María Elena Crespo López  
Laboratório de Farmacologia Molecular – ICB – UFPA (Orientadora)

Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia  
Lab. de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento – ICS – UFPA  
(Co-orientadora)

#### **Banca examinadora:**

Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa  
Avaliador externo

Prof. Dr. José Luiz Matins Nascimento  
Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular – ICB – UFPA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro  
Laboratório de Ensaios in vitro, Microbiologia e Imunologia – ICS - UFPA

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Enéas e Madalena, minhas FONTES de curiosidade e amor ao conhecimento. À minha incomparável esposa, Gizele, meu porto seguro e apoio. Ao meu filho, Matheus, razão de eu querer todos os dias ser melhor.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de admirá-la, percebê-la e compartilhá-la.

Aos meus pais, Enéas e Madalena Fontes, por serem a força e o amor, a determinação e a sabedoria, que me permitiram fincar meus alicerces em rocha sólida.

À minha amada esposa Gizele Fontes, por ser minha maior admiradora, minha maior apoiadora e maior crítica.

Ao meu filho Matheus Fontes, pelo ânimo e alegria persistentes, que me fazem sorrir mesmo nos momentos mais difíceis.

À professora doutora María Elena Crespo López, por me permitir esvaziar-me e ser pequeno e por me orientar no caminho para encher-me, sempre insistindo que eu posso ser maior do que o mundo espera de mim.

À professora doutora Cristiane do Socorro Ferraz Maia, pela amizade, companheirismo, incentivo e apoio. “Uma parte muito importante desta conquista é culpa sua”.

Ao amigo Allan Malaquias, pelos cafés acompanhados de conversas memoráveis e discussões científicas inestimáveis.

À amiga Luanna Fernandes, pelo companheirismo e ajuda imprescindíveis na excussão deste estudo.

Aos companheiros de jornada: Layse Gama, Déborah Oliveira, Danielle Santana, Gabriela Arrifano, Rogerio Monteiro e Ricardo Paraense. A convivência, os diálogos, o companheirismo, os risos, o apoio mútuo, são tesouros bem guadados e que jamais serão esquecidos.

À equipe do laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO) pelo apoio no complexo desenho experimental e nos ensaios comportamentais.

Ao professor doutor Rafael Rodrigues Lima e toda sua equipe pelo apoi na execussão dos ensaios de imunoistoquímica.

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Pará, por fornecer os animais utilizados nesta pesquisa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, pelo apoio e incentivo para minha qualificação profissional.

Ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular pela oportunidade de doutoramento.

*“Mais bem-aventurada coisa é dar do que receber.”*  
(At. 20.35)

## RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é a segunda maior causa de morte no mundo e a principal no Brasil, sendo que 87% dos AVE ocorrem por processos isquêmicos (AVEI). O consumo crônico de etanol, que se inicia geralmente na adolescência, é reconhecido como um fator de risco independente para a elevação da morbidade e mortalidade por AVEI. Apesar de que casos que combinem as duas patologias sejam relativamente frequentes, não há dados disponíveis em modelos animais ou clínicos que demonstrem a qualidade ou mecanismos de interação entre as duas morbidades, e tão pouco suas consequências sobre a intervenção terapêutica. Considerando então os recentes estudos que propõem a minociclina como nova ferramenta terapêutica para o tratamento do AVEI, este estudo teve por objetivo investigar a interação entre a Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC) iniciada na adolescência e o AVEI em córtex motor na fase adulta em ratos, e os efeitos do tratamento com minociclina sobre esta interação, usando parâmetros comportamentais, celulares e moleculares. Ratas Wistar (de 35 dias de idade) foram expostas cronicamente a etanol (6,5 g/kg/dia, 22,5% m/v) ou água por 55 dias. Um dia após o fim da IAC, foi induzida isquemia focal no córtex motor com endotelina-1 (ET-1), seguindo-se sete dias de tratamento com minociclina ou salina. Ao final deste período os animais foram testados em modelos de campo aberto e rota rod. A seguir, os animais foram sacrificados e o córtex dissecado para avaliação dos níveis de nitritos e de peroxidação lipídica. De cada grupo, alguns animais foram perfundidos e o córtex motor submetidos à análise histológica, para avaliação do dano, e histopatológica, para a morte neuronal (anti-NeuN), ativação microglial/macrófagica (Anti-ED1) e astrocitária (anti-GFAP). A intoxicação por etanol a partir da puberdade até a idade adulta potencializou os danos causados pela isquemia, causando grandes perdas na capacidade de iniciar e gerir os movimentos, bem como na coordenação e força motora em comparação aos animais isquêmicos pré-tratados com água. Estas manifestações foram acompanhadas de aumento da perda neuronal, redução do número de células ED1+ e GFAP+ e maiores níveis de nitritos e peroxidação lipídica. O tratamento com minociclina foi eficiente em prevenir/reverter as perdas motoras e danos teciduais induzidos pela isquemia focal, inibindo também a elevação dos marcadores de estresse oxidativo. A IAC tanto isoladamente como sucedida pela isquemia focal, modificaram o desfecho do tratamento com minociclina. Os nossos resultados indicam que a intoxicação com álcool durante a adolescência agrava o déficit motor e danos no tecido em animais sujeitos a isquemia focal no córtex motor. Este processo parece estar associado com a ativação microglial/astrocitária, mas principalmente com o estresse oxidativo. Mostra ainda que o histórico prévio de IAC iniciado na adolescência interfere significativamente no tratamento da isquemia cerebral com minociclina.

**Palavras-chaves:** AVEI, Isquemia focal, Endotelina-1, Etanol, Intoxicação alcoólica crônica, adolescência, minociclina, neurodegeneração, estresse oxidativo, ativação microglial.

## ABSTRACT

Stroke is the second largest cause of death in the world and the leading in Brazil, with 87% of strokes due to ischemic processes. Chronic ethanol consumption, usually beginning in adolescence, is recognized as an independent risk factor for increased morbidity and mortality by stroke. Although cases combining the two diseases are relatively common, there is no data in animals or clinical models demonstrating the quality or mechanisms of interaction between the two morbidities, nor its impact on therapeutic intervention. Considering the recent studies proposing minocycline as a new therapeutic tool for the treatment of stroke, this study aimed to investigate the interaction between the Chronic Alcoholic Intoxication (CAI) started in adolescence and the stroke in motor cortex of adult rats, and the effects of treatment with minocycline on this interaction, using behavioral, cellular and molecular parameters. Female Wistar rats (35 days-old) were chronically exposed to ethanol (6.5 g/kg/day, 22.5% w/v) or water for 55 days. One day after the end of the CAI focal ischemia was induced in motor cortex with the endothelin-1 (ET-1), followed by seven-day treatment with minocycline or saline. After this period, the animals were assayed with open field and rota rod tests. Immediately, animals were sacrificed and cortex was dissected for evaluation of nitrite and lipid peroxidation levels. In all groups, some animals were perfused and the motor cortex subjected to histological analysis to assess the damage, and immunohistochemical labeling to neuronal death (anti-NeuN), microglial/macrophage (anti-ED1) and astrocytes (anti-GFAP) activation. The ethanol intoxication from puberty to adulthood potentiated the damage caused by stroke, causing major losses in capacity to start and running movements as well as the strength and motor coordination compared to ischemic animals pretreated with water. These manifestations were accompanied by increased neuronal loss, reduced ED-1+ and GFAP+ cells and higher levels of nitrite and lipid peroxidation. Treatment with minocycline was effective in preventing/reverse motor deficits and tissue damage induced by focal ischemia, also inhibiting the increase in oxidative stress markers. The CAI either alone with succeeded by focal ischemia, harmed the outcome of treatment with minocycline. Our results indicate that heavy alcohol intoxication during adolescence exacerbates the motor deficit and tissue damage in animals subjected to focal ischemia. This process appears to be associated with microglia/astroglial activation, but mainly with oxidative stress. It also shows that the previous history of CAI started adolescence interferes significantly in the treatment of cerebral ischemia with minocycline.

Keywords: stroke, focal ischemia, Endothelin-1, Ethanol, chronic alcohol intoxication, adolescence, minocycline, neurodegeneration, oxidative stress, microglial activation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT3	Receptor tipo 3 da 5-Hidroxi-Triptamina (Serotonina)
ADP	Adenosina Difosfato
AMPAr	Receptor glutamatérgico ativado pelo ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ATP	Adenosina Trifosfato
AVE	Acidente Vascular Encefálico
AVEH	Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico
AVEI	Acidente Vascular Encefálico Isquêmico
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
Cl <sup>-</sup>	Íon Cloreto
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ERN's	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO's	Espécie Reativa de Oxigênio
ET-1	Endotelina 1
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (Proteína Ácida Fibrilar Glial)
GlyR	Receptor de glicina
GSH-Px	Glutathione Peroxidase
GSH-Rd	Glutathione Redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
IAC	Intoxicação Alcoólica Crônica
i.p.	Intraperitoneal
IF- $\gamma$	Interferon gama
IL-1r	Receptor da Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
iNOS, NOS2	Óxido Nítrico Sintase Induzida/Tipo 2
K <sup>+</sup>	Íon Potássio
LxPxA	Medidas de Largura, Profundidade e Altura
MDA	Malonaldeído

mGlu	Receptor metabotrópico do glutamato
Na <sup>+</sup>	Íon Sódio
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NF-κB	Fator Nuclear kapa B
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NMDAr	Receptor glutamatérgico ativado pelo N-metil-D-aspartato
NMFI	N-metil-2-fenilindol
nNOS, NOS1	Óxido Nítrico Sintase Neuronal/Constitutiva/Tipo 1
NO, NO <sup>•</sup>	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOX	NADPH oxidase
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion Radical Superóxido
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OX	Xantina Oxidase
PBS	Solução Salina Tamponada Com Fosfato
rGABA <sub>a</sub>	Receptor tipo “a” do ácido gama-aminobutírico
RL(s)	Radical Livre
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TLR-4	Receptor Toll-like tipo 4
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
tPA <sub>r</sub>	Ativador de Plasminogênio Tecidual Recombinante

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Patogenia e lesão característica do acidente vascular encefálico isquêmico.	18
<b>Figura 2</b>	Consumo de etanol (equivalência ao etanol puro) <i>per capita</i> para população com idade superior a 15 anos.	21
<b>Figura 3</b>	Principais vias de indução da morte celular por isquemia.	27
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática do desenho experimental.	35
<b>Figura 5</b>	Arena utilizada no teste de atividade locomotora espontânea.	36
<b>Figura 6</b>	Ilustração do Rota rod.	37
<b>Figura 7</b>	Preparo das lâminas para avaliação histológica mediante marcação imunohistoquímica e padronização de leitura.	40
<b>Figura 8</b>	Efeitos da Isquemia focal (AVEI) e/ou da intoxicação alcoólica crônica (IAC) sobre a atividade locomotora espontânea e número de quedas no teste do rota rod.	43
<b>Figura 9</b>	Efeitos da isquemia focal (AVEI) e/ou da intoxicação alcoólica crônica (IAC) sobre a densidade de células analisadas por coloração com violeta de cresila e o número de células NeuN+, ED1+ e GFAP+ do córtex motor.	44
<b>Figura 10</b>	Efeitos da isquemia focal (AVEI) e/ou da intoxicação alcoólica crônica (IAC) sobre as concentrações de (a.) nitrito e (b.) malonaldeído (MDA) por miligrama de proteína em córtex cerebral de ratos.	45
<b>Figura 11</b>	Efeitos da intoxicação alcoólica crônica (IAC) e/ou da minociclina sobre a atividade locomotora espontânea e número de quedas no teste do rota rod.	46
<b>Figura 12</b>	Efeitos da da intoxicação alcoólica crônica (IAC) e/ou do tratamento com minociclina sobre as concentrações de nitritos e malonaldeído (MDA) por miligrama de proteína em córtex cerebral de ratos.	47
<b>Figura 13</b>	Efeitos da Isquemia focal (AVEI) e/ou do tratamento com minociclina sobre a atividade locomotora espontânea e número de quedas no teste do rota rod.	48
<b>Figura 14</b>	Efeitos da Isquemia focal (AVEI) e/ou do tratamento com minociclina sobre a densidade de células analisadas por coloração com violeta de cresila e o número de células NeuN+, ED1+ e GFAP+ do córtex motor.	49
<b>Figura 15</b>	Efeitos da Isquemia focal (AVEI) e/ou do tratamento com minociclina sobre as concentrações de nitritos e malonaldeído (MDA) por miligrama de proteína em córtex cerebral de ratos.	50
<b>Figura 16</b>	Efeitos da Isquemia focal (AVEI), da Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC) e/ou do tratamento com minociclina sobre a atividade locomotora espontânea e número de quedas no teste do rota rod.	51

- Figura 17** Efeitos da Isquemia focal (AVEI), da Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC) e/ou do tratamento com minociclina sobre a densidade de células analisadas por coloração com violeta de cresila e o número de células NeuN+, ED1+ e GFAP+ do córtex motor. 52
- Figura 18** Efeitos da Isquemia focal (AVEI), da Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC) e/ou do tratamento com minociclina sobre as concentrações de nitrito e malonaldeído (MDA) por miligrama de proteína em córtex cerebral de ratos. 53

# Sumário

---

1	Introdução.....	16
1.1	Acidente Vascular Encefálico Isquêmico.....	16
1.2	Etilismo.....	19
1.3	Mecanismos moleculares de dano ao SNC ocasionados pelo etilismo e pela isquemia .....	22
1.3.1	Etilismo.....	22
1.3.2	Mecanismos envolvidos no processo isquêmico .....	25
1.4	Tratamento do AVEI.....	28
1.4.1	Minociclina.....	29
2	Objetivos .....	32
2.1	Geral.....	32
2.2	Específicos.....	32
3	Metodologia.....	33
3.1	Animais e grupos experimentais.....	33
3.2	Modelo de Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC).....	33
3.3	Modelo de Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI).....	34
3.4	Tratamento Pós-cirúrgico.....	34
3.5	Ensaio comportamentais.....	35
3.5.1	Atividade locomotora espontânea.....	36
3.5.2	Rota-rod .....	37
3.6	Ensaio histopatológicos e imunohistoquímica .....	38
3.6.1	Perfusão e preparo de lâminas .....	38
3.6.2	Avaliação histopatológica .....	38
3.6.3	Marcação imunohistoquímica .....	39
3.7	Ensaio de avaliação do estresse oxidativo.....	40
3.7.1	Preparo das amostras .....	40
3.7.2	Avaliação dos níveis de nitritos.....	41
3.7.3	Ensaio de Peroxidação Lipídica .....	41
3.7.4	Concentração de proteína .....	42
3.8	Análise estatística.....	42
4	Resultados.....	43
4.1	Efeitos da intoxicação alcoólica crônica sobre o dano induzido por isquemia focal .....	43
4.1.1	Avaliação do comportamento motor.....	43
4.1.2	Avaliação histológica e imunohistoquímica .....	44
4.1.3	Avaliação do estresse oxidativo .....	45

4.2	Efeitos da minociclina sobre o desfecho da IAC.....	46
4.2.1	Avaliação do comportamento motor.....	46
4.2.2	Avaliação do estresse oxidativo .....	47
4.3	Efeitos da minociclina sobre a isquemia focal .....	48
4.3.1	Avaliação do comportamento motor.....	48
4.3.2	Avaliação histológica e imunohistoquímica.....	49
4.3.3	Avaliação do estresse oxidativo .....	50
4.4	Efeitos da minociclina sobre a isquemia focal precedida de IAC.....	51
4.4.1	Avaliação do comportamento motor.....	51
4.4.2	Avaliação histológica e imunohistoquímica.....	52
4.4.3	Avaliação do estresse oxidativo .....	53
5	Discussão.....	54
5.1	A intoxicação crônica por etanol iniciada na adolescência modifica os efeitos deletérios induzidos pela isquemia.....	56
5.2	Diferenças de sensibilidade à ação da minociclina na isquemia e na IAC.....	64
5.3	A comorbidade modifica a resposta ao tratamento com minociclina.....	67
	Referências .....	70
	Anexos.....	95
	<b>Anexo I</b> – Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	95
	<b>Anexo II</b> – Aspectos histológicos do córtex motor corado com violeta de cresila .....	96
	<b>Anexo III</b> – Imunohistoquímica para NeuN no córtex motor. ....	97
	<b>Anexo IV</b> – Imunohistoquímica para ED1 no córtex motor.....	98
	<b>Anexo VI</b> - Imunohistoquímica para GFAP no córtex motor. ....	99

# 1 Introdução

---

## 1.1 Acidente Vascular Encefálico Isquêmico

O termo Acidente Vascular Encefálico (AVE) é destinado a definir uma série de eventos cerebrovasculares que conduzem a lesão do tecido encefálico, repercutindo sobre a função da região afetada e estruturas relacionadas. Neste contexto, se posiciona como uma das principais patologias disfuncionais incidentes sobre a população humana, registrando-se mais de 15 milhões de casos, além de ocupar o segundo lugar mundial em causa de óbitos, compreendendo 6,7 milhões de mortes anuais (11,9% do total de eventos) (W.H.O., 2014b).

Nos Estados Unidos da América (EUA), onde os AVE representam a principal causa disfuncional, estima-se uma ocorrência em 6,8 milhões de indivíduos maiores de 20 anos. Acompanhando a tendência mundial, a maior incidência é sobre o gênero feminino: dos cerca de 795.000 casos registrados no ano de 2008, observou-se uma ocorrência de 55.000 casos a mais entre as mulheres em relação aos homens (Go *et al.*, 2013). No Brasil, esta patologia ocupa o segundo lugar em causa de internações hospitalares (cerca de 230.000 anualmente) e mortes (aproximadamente 90.000 mortes/ano) (Lotufo, 2005; Lotufo e Bensenor, 2005; Ms, 2013).

Estes episódios podem ser subdivididos em Acidente Vascular Encefálico Hemorrágicos (AVEH), que se caracteriza pelo extravasamento do conteúdo sanguíneo para o tecido encefálico ou seu entorno; e Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI), promovido pela redução ou obstrução do fluxo sanguíneo para o cérebro, gerando déficit de fornecimento de oxigênio e glicose (Adams *et al.*, 1993).

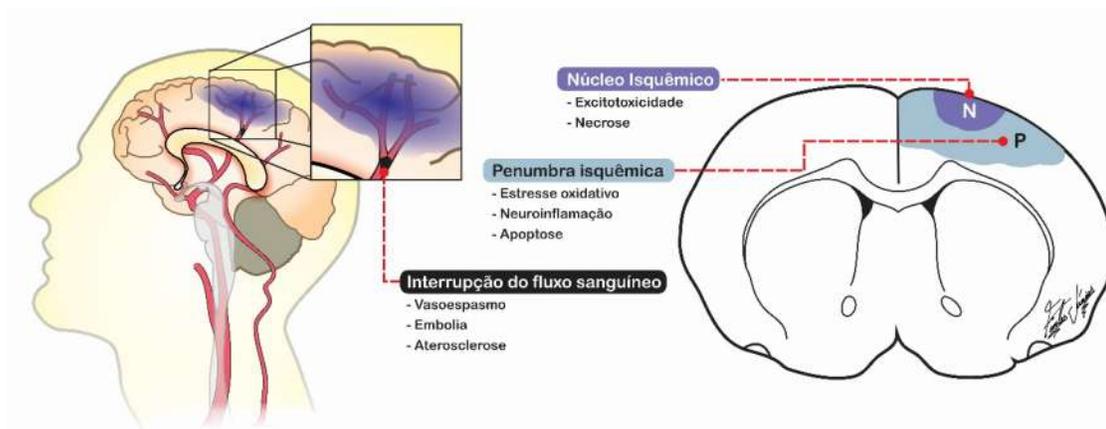
Entre os casos registrados é observada uma predominância dos eventos isquêmicos. Enquanto os acidentes hemorrágicos cerebrais compreendem 10% dos casos e as hemorragias subaracnóide 3%, os AVEI englobam 87% dos eventos (Adams *et al.*, 1993; Mergenthaler *et al.*, 2004; Rosamond *et al.*, 2007; W.H.O., 2014b).

As origens do evento isquêmico estão associadas a processos patológicos crônicos, como a aterosclerose, embolia e lesões lacunares, mas também podem se desencadear agudamente devido a cardio embolismo, cirurgia cerebrovascular ou traumas mecânicos. Em todos os casos, há como consequência da lesão vascular uma redução da seção transversal dos vasos de condutância, promovendo a redução do aporte sanguíneo para as regiões irrigadas por estes (Adams *et al.*, 1993; Mergenthaler *et al.*, 2004).

A restrição de fluxo impacta drasticamente sobre a homeostasia tecidual, isto porque o equilíbrio bioquímico do Sistema Nervoso Central (SNC) é mantido por uma rigorosa cadeia de reações. Apesar de representar cerca de 2% da massa corpórea, o encéfalo consome 20% do oxigênio captado pelo organismo, funcionando em um nível de equilíbrio oxidativo muito delicado (Doyle *et al.*, 2008). Em adição, estima-se que o encéfalo reponde por 75% do consumo diário de glicose (González, 2006).

Como consequência da redução do aporte de oxigênio e glicose, se instala um complexo degenerativo desencadeado por mecanismos oxidativos, neuroinflamatórios e de morte celular, que se desenvolvem em função do nível de isquemia, distância do foco isquêmico e do tempo decorrido do evento, considerando ainda a influência da reperfusão. Alguns destes mecanismos se desencadeiam imediatamente após o evento isquêmico. Outros, entretanto, acontecem dentro de algumas horas e ainda depois de dias (González, 2006; Doyle *et al.*, 2008).

A lesão característica é formada por uma região de intensa e rápida morte celular, por necrose e excitotoxicidade, a qual é denominada núcleo isquêmico. Nas regiões adjacentes, onde a circulação colateral minimiza os efeitos do acidente vascular, a perda neuronal é menor e mais lenta, por isto denominada penumbra isquêmica (figura 1). Na região de penumbra é observada forte influência de processos oxidativo, neuroinflamatórios, e apoptóticos (Mergenthaler *et al.*, 2004; González, 2006; Doyle *et al.*, 2008). As alterações observadas durante o período de anóxia são potencializados no restabelecimento do aporte de oxigênio, gerando intensa perda tecidual por estresse oxidativo (Doyle *et al.*, 2008; Endres *et al.*, 2008).



**Figura 1** – Patogênese (à esquerda) e lesão característica (à direita) do acidente vascular encefálico isquêmico.

Além da elevada letalidade, com uma média mundial de 22,9% de óbitos no primeiro evento isquêmico, os AVEI são uma frequente causa de déficits na capacidade motora, cognitiva e de comunicação, comprometendo a atividade laboral e convivência social. Entre as manifestações mais proeminentes se destacam alterações motoras, como parestia, espasticidade, dificuldades e incapacidades motoras, que atingem cerca de 38% dos sobreviventes. São referidas também a perda da memória, que chega a atingir cerca de 23% dos pacientes; perda da capacidade de reconhecimento, afasia, apraxia, disfunção executiva e transtornos de humor (Watkins *et al.*, 2002; Welmer *et al.*, 2006; Snaphaan e De Leeuw, 2007; Lundstrom *et al.*, 2008).

Assim, estudos realizados em ratos submetidos a isquemia cerebral revelam grande redução na atividade locomotora espontânea, avaliada a través da observação do animal em um campo aberto, e marcante perda da coordenação motora, verificada no teste do “rota rod” (Yousuf *et al.*, 2010; Mestriner *et al.*, 2013). O teste de “rota rod” proposto por Dunham e Miya (1957) é destinado a estudar a força e coordenação motora, considerando a capacidade de adaptação e permanência dos animais sobre uma base cilíndrica giratória. Um prejuízo na função motora dos membros também já foi demonstrado, quando os animais foram submetidos ao teste do plano inclinado (Yamamoto *et al.*, 1989; Wahl *et al.*, 1992). Este teste é capaz de avaliar a coordenação motora, considerando também a força motora das extremidades, e o equilíbrio dos animais (Murphy *et al.*, 1995).

Observações equivalentes se reproduzem nos trabalhos conduzidos por Pinedo-Otaola e De La Villa (2000) e Hobart *et al.* (2002), onde foram identificados como principal dificuldade no pós-AVEI as disfunções motoras, visto que reduzem o grau de independência dos

pacientes. Nestes estudos cerca de 28% dos pacientes necessitaram de acompanhamento hospitalar ou domiciliar para execução de atividades rotineiras e somente 5-9% eram totalmente independentes.

Considerando os fatores predisponentes e agravantes, o consumo excessivo de etanol tem sido identificado como um potencial fator de risco para o AVEI (Gill *et al.*, 1986; Beghi *et al.*, 1995). Diversos autores o incluem entre os cinco fatores de risco mais importantes para carga global de doenças e que quase 60% destas estão inclusas nas categorias de doenças crônicas, doenças neuropsiquiátricas, diabetes, cirrose hepática, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, como o AVEI (Rehm *et al.*, 2003; Gilman, 2006; Michael e Shaughnessy, 2006; Otero Palleiro e Barbagelata Lopez, 2007; O'donnell *et al.*, 2010).

Um dos poucos estudos realizados nesse contexto identificou o etanol como responsável por 16% dos casos de isquemias em paciente entre 18 e 45 anos (Otero Palleiro e Barbagelata Lopez, 2007), corroborando com estudos anteriores que demonstram um aumento na incidência de isquemias cerebrais de forma dose-dependente, com uma elevação de risco em torno de 60% (Iso *et al.*, 2004). Adicionalmente, o etanol agrava o quadro clínico agudo e o decurso da doença (Beghi *et al.*, 1995).

## 1.2 Etilismo

O consumo de substâncias psicoativas é um comportamento frequente na população humana. Dentre estas substâncias, o etanol ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ ) se destaca por sua aceitação social e comércio legalizado na maior parte do planeta, o que contribui em vários níveis para que seja a droga mais consumida mundialmente (Sanchis e Aragón, 2007; Elliott e Bower, 2008; Khalsa *et al.*, 2008; Uhart e Wand, 2009).

A introdução a este hábito se inicia geralmente na adolescência, sendo marcado por um consumo de doses elevadas e com maior assiduidade. Tal característica está associada à facilidade na aquisição desta droga e a forte vinculação cultural e publicitária a estados de excitação, interação social e sexualidade (Carvalho *et al.*, 1995; Sanchis e Aragón, 2007; Schuckit, 2009).

Como outras drogas psicoativas, o etanol é marcado pela necessidade do aumento de sua dose para manutenção de seus efeitos. A intensidade e velocidade de instalação deste fenômeno possui associação direta com a frequência e dose de consumo. Acompanhando o desenvolvimento da tolerância, é observada também a instalação da dependência, neste caso específico denominada de etilismo (Mendenhall *et al.*, 1980; Anton *et al.*, 1996; Pombo *et al.*, 2015).

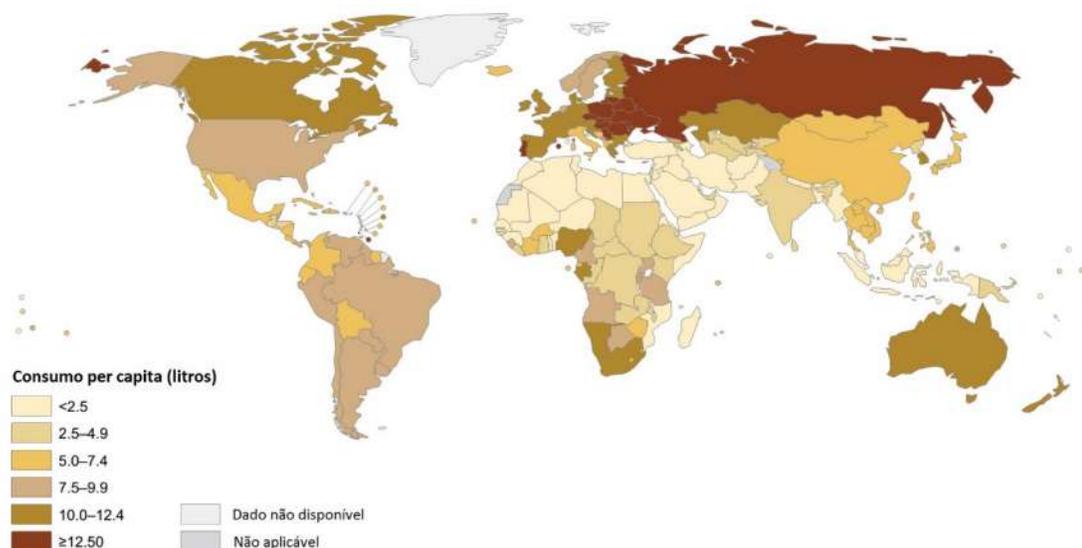
O etilismo é um distúrbio psiquiátrico crônico, caracterizado pelo consumo compulsivo do álcool. Os componentes genéticos deste mal incidem sobre a suscetibilidade a tolerância aos efeitos do álcool, as alterações na capacidade de controle motor e a síndrome de abstinência. O conjunto destas manifestações investem uma dificuldade em controlar o consumo, caracterizando o quadro de compulsão (Knopik *et al.*, 2009; Tobamidanik e Zabkiewicz, 2009).

O início precoce do consumo alcoólico é observado como fator predisponente ao etilismo. Quando desenvolvido na adolescência demonstra maior gravidade, o que é associado ao processo de crescimento e maturação do sistema nervoso central. De fato, o etanol afeta as funções encefálicas de forma diferente na puberdade e vida adulta, sendo o adolescente mais sensível ao seu efeito neurotóxico (Markwiese *et al.*, 1998; White e Swartzwelder, 2005; Zeigler *et al.*, 2005). Por outro lado, a menor susceptibilidade do adolescente a sedação e às alterações motoras implicam geralmente em maior consumo (Little *et al.*, 1996; Silveri e Spear, 1998; White *et al.*, 2002).

O consumo alcoólico na puberdade, portanto, interfere de forma marcante sobre as mudanças nos mecanismos moleculares ou mesmo anatômicas ocorrentes neste período, essenciais para a estruturação das funções cognitivas e comportamentais (Jernigan *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1993; Alfonso-Loeches e Guerri, 2011). A estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta cerca de três milhões de mortes diretamente associadas ao consumo alcoólico excessivo. O mesmo também assume causalidade de aproximadamente 4% das morbidades ao redor do planeta. Tal avaliação se agrava pela previsão de aumento do consumo de álcool nas próximas décadas, identificando as mulheres e os adultos jovens como grupos de maior participação na elevação deste índice (Schuckit, 2009).

O mercado europeu de bebidas alcoólicas movimenta cerca de 100 bilhões de euros, com uma média de consumo anual equivalente de mais de 12,5 litros de etanol puro por habitante. Na América do Norte e no Brasil está entre 7,5 e 9,99 litros por habitante (ver figura 1) (Spanagel, 2009; W.H.O., 2014a).

Dentro deste contexto, o Brasil, que estava na 63ª posição no último relatório da OMS, passa a ocupar a 62ª posição no mundo em consumo de álcool *per capita* (para pessoas com idade igual ou superior a 15 anos). Estes dados reforçam a tendência ao aumento de consumo de bebida alcoólica. Apesar de não ter sido observado aumento significativo no percentual de bebedores entre 2006 e 2012 (48% e 52% respectivamente), houve um aumento de 20% entre os etilistas frequentes (que bebem uma vez por semana ou mais), com destaque para as mulheres, onde o aumento foi de 34,5%. O consumo em modo “binge” (grandes doses e curto período de tempo – 2h) cresceu 31,1% e 17% dos bebedores apresentaram manifestações claras de abuso/dependência, o equivalente a 6,8% da população nacional (Carlini *et al.*, 2002; Galduroz e Caetano, 2004; Laranjeira *et al.*, 2014).



**Figura 2** – Consumo de etanol (equivalência ao etanol puro) *per capita* para população com idade superior a 15 anos. Estimativa gerada a partir da média de consumo entre os anos de 2003 a 2005. Fonte: Adaptado de W.H.O. (2014a).

Além de seus efeitos socioeconômicos, o alcoolismo constitui um importante fator de risco na ocorrência de doenças, como hipertensão arterial, fibrilação atrial, doenças vasculares, neoplasias e isquemias cerebrais, além de promover prejuízo cognitivo, motor e de memória (Otero Palleiro e Barbagelata Lopez, 2007).

No estudo de Li *et al.* (2008), onde os animais foram tratados com etanol 6% (v/v) por um período de 28 dias, sendo avaliados no 7°, 14°, 21° e 28° dias no teste do campo aberto, foi observada uma progressiva redução da atividade locomotora, chegando a 64% da atividade demonstrada pelo grupo controle.

Todas essas alterações motoras e efeitos deletérios descritos para o etilismo, assim como aqueles descritos acima para o AVEI, são consequências diretas do desencadeamento de diversos mecanismos moleculares subjacentes, muitas vezes partilhados por ambas as patologias.

### 1.3 Mecanismos moleculares de dano ao SNC ocasionados pelo etilismo e pela isquemia

#### 1.3.1 Etilismo

O etanol é capaz de interferir em inúmeros processos biológicos. Esta propriedade tem sido associada a suas características físico-químicas, sendo ele uma pequena molécula (Massa molecular = 46,05 u) polar e anfifílica (Ferreira e Willoughby, 2008), e com sua capacidade de interagir com múltiplos sítios (Brick *et al.*, 1987; Harris, 1999; Nagy *et al.*, 2002; Muggironi *et al.*, 2013).

Os estudos de seu mecanismo de ação, até a década de 1980, atribuíam suas ações a interferências não-específicas nas bicamadas lipídicas neuronais, denominado de saturação da membrana (Johnson *et al.*, 1979; Harris, 1999). No entanto, estudos posteriores revelaram que este mecanismo não era suficiente para justificar os principais efeitos promovidos por ele (Buck *et al.*, 1989). Tal constatação conduziu à busca dos sítios de ação do etanol, direcionando-se a atuação sobre grupos proteicos (Wang e Sun, 2001; Hirono *et al.*, 2009; Perkins *et al.*, 2010).

Atualmente, inúmeros trabalhos têm revelado a atuação do etanol sobre canais iônicos dependentes de ligante, canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem (Narahashi *et al.*, 2001; Davies, 2003) e enzimas associadas a síntese de segundos mensageiros (Pandey, 1998; Proctor *et al.*, 2003). Os resultados de sua atividade são fortemente correlacionados a dose consumida

e a frequência de consumo, mas também tem relação com a estrutura molecular dos sítios receptores (Narahashi, 2000; Wallner *et al.*, 2003; Loureiro *et al.*, 2012).

Entre os alvos mais bem estudados encontram-se os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAr) e o receptor subtipo “a” do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (rGABAa). Outros alvos apontados por pesquisas incluem receptores de glicina, o receptor tipo 3 da serotonina (5-HT3) e nicotínicos neuronais. Todos estes pertencem a família dos receptores ionotrópicos, ou seja, são canais iônicos regulados por ligante (Lovinger, 1999; Narahashi *et al.*, 1999; Knapp *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2005; Vengeliene *et al.*, 2008).

Como em diversas outras vias, a atuação do etanol sobre os receptores NMDA é dual. Agudamente ele inibe o NMDAr, mas no consumo crônico ele induz o aumento da expressão deste (Krystal *et al.*, 2011). Este padrão de neuroadaptação corrobora para a manifestação excitotóxica característica no abuso e na abstinência ao etanol (Chandler *et al.*, 1993; Self *et al.*, 2005; Roberto *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007).

A atividade dos receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) no transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  é fundamental para neurotransmissão excitatória rápida, necessária ao processo de cognição, memória e desenvolvimento neuronal (Wirkner *et al.*, 1999; Vyklicky *et al.*, 2014). A ativação excessiva, por outro lado, contribui para o prejuízo cognitivo e motor verificados nos etilistas crônicos (Ahern *et al.*, 1994; Dodd *et al.*, 2000; Ron e Wang, 2009).

Na principal via inibitória do SNC, a via gabaérgica, o etanol atua interferindo na atividade dos receptores GABAa, que são canais de cloreto regulados por ligante. Interfere também nos processos de liberação do GABA pelos neurônios. Agudamente ocorre a potencialização dos efeitos do GABA (Suzdak e Paul, 1987; Grobin *et al.*, 1998), comprometendo a cognição e coordenação motora, promovendo também efeito ansiolítico, sedação e desinibição comportamental (Cagetti *et al.*, 2003; Fehr *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009; Heilig *et al.*, 2011; Hulin *et al.*, 2012).

No consumo crônico é verificada a instalação de tolerância, com ajuste funcional de receptores GABAa, que parece ocorrer em nível de expressão gênica (Cagetti *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2004; Biggio *et al.*, 2007; Enoch, 2008).

O etanol atua também sobre a ativação de receptores de glicina (GlyRs – canais de  $\text{Cl}^-$  regulados por ligante), ligando-se ao domínio transmembrana entre as subunidades do

receptor (Borghese *et al.*, 2012). Como é ampla a distribuição destes receptores no encéfalo e medula espinhal, também serão os efeitos interferentes do etanol. Suas ações sobre os receptores medulares podem elucidar algumas alterações motoras, bem como alterações do ritmo respiratório induzidos pelo etanol (Zhang *et al.*, 2003; Eggers e Berger, 2004; Yevenes e Zeilhofer, 2011).

A interferência neuroquímica é ainda acompanhada de mudanças bioquímicas bastante complexas, envolvendo mecanismos de excitotoxicidade, estresse oxidativo e neuroinflamação. De fato, cada um destes mecanismos está associado à modalidade de consumo, ao tempo de consumo e à dose (Brown e Tapert, 2004; Zeigler *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2008).

O padrão inicial de consumo, geralmente marcado pela ingesta excessiva seguida de períodos de abstinência, é seguido da hiperativação de receptores NMDA e conseqüentemente do influxo de  $Ca^{2+}$ , constituindo um ambiente excitotóxico que conduz a morte celular (Swartzwelder *et al.*, 1995; Pascual *et al.*, 2009).

Já na fase mais avançada, onde há ingestão crônica de etanol, este induz a ativação da micróglia e astróglia, aumentando os níveis teciduais de citocinas, com elevação da atividade da caspase-3, indução da ciclooxigenase 2 e da óxido nítrico sintase induzida no córtex cerebral (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010).

A neuroinflamação induzida pelo álcool é promovida diretamente por sua capacidade de ativar os receptores toll-like 4 (TLR-4) em astrócitos, micróglia e macrófagos; e receptores de interleucina1 (IL-1r), elevando a expressão do NF- $\kappa$ B e conseqüentemente dos demais mediadores do processo neuroinflamatório (Blanco *et al.*, 2005; Blanco e Guerri, 2007; Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2008; Alfonso-Loeches *et al.*, 2010).

Como consequência da neuroinflamação alcoólica, são observados quadros de atrofia da matéria branca e perda neuronal em todo o encéfalo, com maior destaque para o córtex frontal, hipotálamo, e tálamo (Harper *et al.*, 2003; Harper e Matsumoto, 2005).

### 1.3.2 Mecanismos envolvidos no processo isquêmico

O metabolismo do SNC é marcado por uma elevada demanda energética, principalmente associada à manutenção do equilíbrio iônico das células nervosas. A sustentação da atividade das proteínas transportadoras de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) dependentes de adenosina trifosfato (ATP), por exemplo, consome cerca de 70% de toda a demanda energética do encéfalo (Doyle *et al.*, 2008).

Eventos que promovam déficits na oferta de oxigênio, como a isquemia, geram uma queda marcante na produção mitocondrial de ATP e os estoques são rapidamente consumidos, fazendo cessar a atividade das  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases. Este fato conduz à despolarização da membrana plasmática e intensa liberação de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para o citosol (Caplan, 2000; Doyle *et al.*, 2008; Caplan, 2011).

Sequencialmente, há uma ativação generalizada de enzimas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (lipases, proteases, DNAses). A atividade destas enzimas, somada às limitações anabólicas promovem intensa morte celular por necrose (Doyle *et al.*, 2008).

Outra implicação é o aumento da liberação de glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC. Este evento ocorre tanto pela inversão do transportador de glutamato dependente de  $\text{Na}^+$ , forçado pelo acúmulo de  $\text{Na}^+$  no meio citosólico, quanto pela liberação de vesículas glutamatérgicas, devido ao aumento de cálcio intracelular (Lipton, 1999; Liu *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2006).

A atividade glutamatérgica é mediada pela ativação dos receptores ionotrópicos, como os receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) e do ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA), além dos receptores metabotrópicos (mGlu). Os ionotrópicos são canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , influenciando sobre a polaridade da membrana dos neurônios e a ativação dos mecanismos dependentes do  $\text{Ca}^{2+}$ . Os metabotrópicos atuam por meio da proteína G, favorecendo a despolarização e modulando a atividade dos receptores ionotrópicos. A hiperatividade desta via está intimamente relacionada com o processo de excitotoxicidade, estimulando a despolarização de membranas e o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Olney, 1969; Pellegrini-Giampietro, 2003; Liu *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2006).

Essa excitotoxicidade implica que, no processo isquêmico, instala-se um estado de estresse oxidativo, ou seja, uma produção de Radicais Livres (RLs) e espécies reativas em níveis superiores à capacidade de eliminação do sistema antioxidante (Kondo *et al.*, 1997; Fujimura *et al.*, 1998; Fujimura *et al.*, 1999). Este mecanismo se inicia durante a anóxia tecidual, mas atinge seu nível máximo durante a reperfusão (Fiskum *et al.*, 1999; Kroemer e Reed, 2000; Chan, 2001).

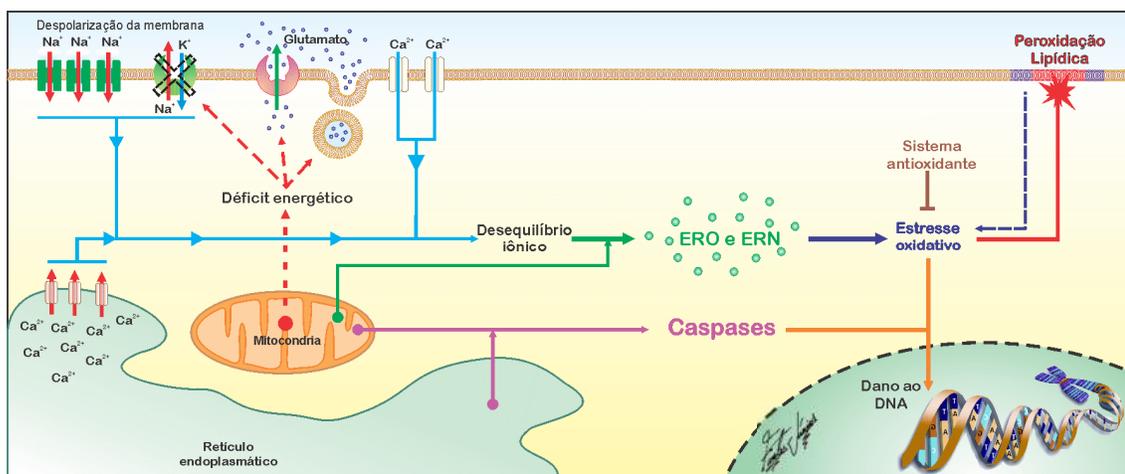
O termo radical livre designa uma substância (átomo ou molécula) que apresenta elétrons desemparelhados, o que lhe confere alta reatividade. No sistema biológico, muitas destas espécies são radicais de oxigênio ou nitrogênio, sendo então designadas de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) e de Nitrogênio (ERN's) respectivamente. Estes termos englobam também espécies não radicalares que apresentam elevada reatividade associada a sua instabilidade molecular. A formação destas espécies reativas ocorre com a atividade enzimática durante os processos de transferência de elétrons no metabolismo celular (Halliwell, 1992). Dois mecanismos fundamentais estão vinculados ao estresse oxidativo no AVEI, a superprodução de óxido nítrico (NO) e a alteração da atividade mitocondrial.

O NO é um radical livre produzido por diversas células, desempenhando funções cruciais, como a modulação do fluxo sanguíneo, da resposta inflamatória/imunológica e atividade neural. Sua síntese ocorre a partir do metabolismo da L-arginina pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS), que pode ser encontrada em duas isoformas, a constitutiva (nNOS ou NOS1), que é regulada pela concentração citosólica de  $Ca^{2+}$ ; e a induzida (iNOS ou NOS2), que é regulada em nível de expressão gênica (Bredt e Snyder, 1990; Lacza *et al.*, 2003).

Como apontado anteriormente, a despolarização e a excitotoxicidade desencadeadas pelo AVEI promovem a elevação da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ . Neste ambiente, a síntese de Óxido Nítrico sofre um aumento significativo pela ativação da NOS1, dependente de  $Ca^{2+}$ . Experimentos de indução isquêmica focal revelam uma elevação nos níveis de NO de 10  $\eta$ mol/L para 2  $\mu$ mol/L, minutos após a supressão de oxigênio (Dalkara e Moskowitz, 1994).

Mais tardiamente, as concentrações de NO são densamente reforçadas pela síntese via NOS2. Apesar de ter atividade mínima no contexto fisiológico, esta enzima sofre grande expressão nas células microgliais e leucócitos durante processos neuroinflamatórios, como no AVEI. Note-se que a expressão de NOS2 não é significativa antes de 24h, sendo demonstrado

que a administração de inibidores desta enzima até um dia após a oclusão reduz significativamente a área de lesão (Iadecola, 1997; Iadecola *et al.*, 1997).



**Figura 3** – Principais vias de indução da morte celular por isquemia.

O potencial lesivo do NO está em parte vinculado a reação com radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), mediada pela enzima superóxido dismutase. Como resultante, há a formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), espécie altamente citotóxica (Beckman, 2001). O principal aspecto desta citotoxicidade situa-se em sua capacidade de gerar peroxidação lipídica em membranas, lipossomas e lipoproteínas (Radi *et al.*, 1991).

A reação de peroxidação inicia-se com o sequestro de hidrogênio de ácidos graxos polinsaturado, formando radicais lipídicos. Estes radicais reagem com o  $\text{O}_2$ , formando radicais peroxilas, radicais de hidroperóxido, dienos e aldeídos, como o malonaldeído (Denicola e Radi, 2005). Estes por sua vez, atacam outros lipídios de membrana, propagando o dano (Radi *et al.*, 1991).

Em consequência da peroxidação lipídica ocorrem alterações na permeabilidade das membranas, promovendo desequilíbrio iônico e liberação de enzimas líticas. O dano das membranas facilita também a penetração dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e sua reação com as estruturas celulares (Ferreira e Matsubara, 1997; Thanan *et al.*, 2014).

Nas mitocôndrias, o excesso de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e ADP no citosol induzem a superprodução de EROS, especialmente os radicais superóxido e hidroxila (Sugawara e Chan, 2003). De fato a mitocôndria também produz NO, através de uma NOS mitocondrial (dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Brookes, 2004). A produção destes radicais é tão intensa, que supera os mecanismos tipo *scavenger* (redução ou eliminação o potencial oxidativo de outra molécula por reação direta), potencializando os danos aos lipídios de membrana, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Halliwell, 1994; Fiskum *et al.*, 1999; Kroemer e Reed, 2000; Chan, 2001; Sugawara e Chan, 2003).

Apesar de todo o prejuízo, é importante mencionar que o NO atua também na redução da área lesada. A fração produzida pela NOS endotelial (eNOS) desempenha atividade protetora, através de seus efeitos vasodilatador, anti-inflamatório e antitrobótico (Endres *et al.*, 2004).

Mesmo no contexto fisiológico do SNC, marcado por um intenso metabolismo aeróbico, o controle da formação de espécies oxidativas e radicais livres exige um sistema antioxidante eficiente (Coyle e Puttfarcken, 1993). Esta tarefa é desempenhada pelas enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutationala-peroxidase (GSH-Px) e glutationala-redutase (GSH-Rd) e pelos antioxidantes não enzimáticos glutationala reduzida (GSH) e vitaminas antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico (Hebbel, 1986; Warner *et al.*, 2004). Nos processos isquêmico e principalmente na reperfusão, devido a superprodução de espécies reativas, há redução da atividade e expressão destas enzimas 24 horas e até 7 dias após o surto isquêmico (Valko *et al.*, 2007; Cojocar *et al.*, 2013).

#### 1.4 Tratamento do AVEI

O tratamento clássico para pacientes isquemizados baseia-se fundamentalmente no reestabelecimento do fluxo sanguíneo para as áreas afetadas. Apesar dos protocolos complexos que visam garantir a sobrevivência do paciente, bem como reduzir a ocorrência de sequelas, esta terapêutica é ainda muito limitada em prevenir os danos recorrentes (N.I.N.D.S., 1995; Weir *et al.*, 2004; Ginsberg, 2008).

O fármaco base neste procedimento é o ativador de plasminogênio tecidual recombinante (tPA), que deve ser administrado em até 3 horas após o incidente. Em um estudo conduzido pelo N.I.N.D.S. (1995) acompanhando 624 pacientes, a utilização da tPA reduziu consideravelmente o percentual de pacientes com prejuízos motores ou cognitivos graves. Destaca-se ainda que em 50% dos casos estes prejuízos eram mínimos ou ausentes (N.I.N.D.S., 1995; Chiu *et al.*, 1998; Ginsberg, 2008).

O grande entrave a este tratamento se deve a elevação em dez vezes do risco de hemorragia intracerebral, sendo observados também a elevação da incidência de déficit neurológico e edema cerebral (Riggs, 1996). Observou-se ainda o aumento da atividade/expressão de receptores de glutamato, o que dispara mecanismos excitotóxicos e de apoptose (Nicole *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2004).

Apesar das vantagens observadas no tratamento com tPA, há uma carência relativamente grande de um fármaco que contenha os danos do tratamento e da reativação do fluxo sanguíneo. Entre as drogas estudadas, enumeram-se drogas bloqueadoras dos canais de cálcio, antagonistas glutamatérgicos, agonistas GABAérgicos, inibidores da ativação e migração leucocitária, antioxidantes, altas doses de albumina entre outros. Apesar de estes demonstrarem neuroproteção experimental, os ensaios em humanos não evidenciaram benefício real (Ginsberg, 2008).

Uma perspectiva promissora neste contexto surgiu a partir do trabalho de Yrjanheikki *et al.* (1998), evidenciando um efeito neuroprotetor do antibiótico minociclina em modelo animal de isquemia, o que também se reproduziu em humanos (Lampl *et al.*, 2007).

#### 1.4.1 Minociclina

A minociclina é um fármaco semissintético pertencente à classe das tetraciclinas, um grupo de antibióticos bacteriostáticos originalmente isolados a partir da bactéria *Streptomyces aureofaciens*, encontrada no solo (Good e Hussey, 2003; Sapadin e Fleischmajer, 2006). A partir da primeira tetraciclina, a oxitetraciclina, foram feitas modificações moleculares no intuito de aumentar sua atividade antimicrobiana, melhorar a absorção e sua

meia-vida. Entre os novos fármacos, em 1967, foi sintetizada a minociclina (Yrjanheikki *et al.*, 1999; Kim e Suh, 2009; Nelson e Levy, 2011).

A farmacocinética desta droga é marcada por uma biodisponibilidade oral elevada e lipofilicidade até 5 vezes maior que seu protótipo. Estas características promovem uma abrangente distribuição corporal, com concentrações elevadas no SNC (Good e Hussey, 2003; Blum *et al.*, 2004).

A descoberta de sua atuação como neuroprotetor em patologias neurodegenerativas, tanto em cultura como em animais e no uso clínico, tendem agora a redefinir a utilização deste fármaco (Yrjanheikki *et al.*, 1998; Yong *et al.*, 2004).

O principal mecanismo sugerido para tal é a inibição da ativação de células gliais/macrófagos, que foi evidenciado pela redução da população de células positivas para marcação imunohistoquímica com anti-ED1  $\gamma$ . Além disto a minociclina interfere nos processos de neuroinflamação, estresse oxidativo e apoptose (Yong *et al.*, 2004; Kim e Suh, 2009; Li e Mccullough, 2009).

Com relação à resposta imunológica/inflamatória, esta droga tem evidenciado atividade redutora das concentrações teciduais de ciclooxigenase 2/prostaglandinas, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que em parte estão vinculadas a sua atividade inibitória da ativação microglial (Matsukawa *et al.*, 2009; Noble *et al.*, 2009; Plane *et al.*, 2010; Gupta e Chauhan, 2011).

No processo de estresse oxidativo, a minociclina apresentou efeito antioxidante do tipo *scavenger*, com potência comparável ao da vitamina E. Sua utilização em modelos experimentais promoveu redução na formação de nitrito e peroxinitrito, na nitração de proteínas e na peroxidação de fosfolípidios (Kraus *et al.*, 2005).

A minociclina tem demonstrado também efetividade em reduzir a gravidade da lesão isquêmica, contribuindo para a redução do prejuízo motor consequente desta. Fan *et al.* (2006) verificaram a normalização da atividade locomotora no teste do campo aberto, quando os animais isquemizados eram tratados com minociclina. Resultados semelhantes foram identificados também para a coordenação motora, avaliada no teste do rota rod (Hayakawa *et al.*, 2008).

Apesar de a minociclina destacar-se como uma alternativa promissora ao tratamento do AVEI, promovendo a inibição de mecanismos chave no processo de dano tecidual e morte celular, nenhum estudo anterior verificou sua atividade em casos onde o indivíduo em quadro isquêmico é etilista crônico. Neste contexto, o presente trabalho se propõe a estudar a influência da intoxicação alcoólica crônica sobre a isquemia cerebral e, por conseguinte, os efeitos da minociclina sobre este quadro de comorbidade. Pretende ainda elucidar as influências sobre o comportamento motor, perda neuronal, atividade das células gliais e o estresse oxidativo no córtex motor de ratos.

## 2 Objetivos

### 2.1 Geral

Investigar a interação entre a Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC) iniciada na adolescência e o Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI) em córtex motor na fase adulta em ratos, e os efeitos do tratamento com minociclina sobre esta interação, usando parâmetros comportamentais, celulares e moleculares.

### 2.2 Específicos

Analisando parâmetros comportamentais de deambulação espontânea, força e equilíbrio (testes de campo aberto e rota rod), parâmetros celulares indicativos de neurodegeneração e ativação astrocitária e microglial (imunohistoquímica com NeuN+, GFAP+ e ED1+) e parâmetros de estresse oxidativo (níveis de nitritos e peroxidação lipídica):

- Investigar a possível influência mútua entre a IAC e o AVEI, qualificando-a quanto a sua modalidade (antagonismo ou sinergismo).
- Estudar os efeitos da minociclina sobre o desfecho da IAC iniciada na adolescência.
- Analisar os efeitos da minociclina sobre o AVEI focal em córtex motor.
- Estudar os efeitos da minociclina sobre a comorbidade (IAC iniciada na adolescência seguida por AVEI) no córtex motor na idade adulta, verificando se esta interfere no desfecho do tratamento.

### 3.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* Wistar, fêmeas (n=80), com 1 mês de vida, pesando aproximadamente 75 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará (UFPA). As condições de alojamento foram padronizadas (temperatura –  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ; ciclo de luz claro/escuro de 12 horas; água e comida *ad libitum*).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE), registrado sob o parecer BIO007-09 (Anexo I), obedecendo-se as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais (Hubrecht e Kirkwood, 2010).

Os animais foram distribuídos em grupos de 10, sendo identificados como apresentado na tabela 1.

Grupo	Identificação	n
1 Controle	Controle	10
2 Tratamento com minociclina	MIN	10
3 Isquemia focal	AVEI	10
4 Isquemia focal tratada com minociclina	AVEI x MIN	10
5 Intoxicação Alcoólica Crônica	IAC	10
6 Intoxicação Alcoólica Crônica tratada com minociclina	IAC x MIN	10
7 Intoxicação Alcoólica Crônica seguida de Isquemia focal	IAC+AVEI	10
8 Intoxicação Alcoólica Crônica seguida de Isquemia focal, tratado com minociclina	IAC+AVEI x MIN	10

**Tabela 1** – Distribuição e identificação dos grupos experimentais.

### 3.2 Modelo de Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC)

Aos 35 dias de vida, que equivale à fase da puberdade, foi iniciada administração, por gavagem, de etanol 6,5 g/kg/dia, adaptado de Maier e West (2001). O tratamento se encerrou aos 90 dias de vida, que equivale à fase adulta. Os animais controle receberam água, por gavagem, durante o mesmo período (Figura 02).

### 3.3 Modelo de Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI)

O procedimento cirúrgico guiado por estereotaxia foi realizado no dia seguinte à última administração de etanol. Para tanto, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina + Xilazina (72 mg/Kg + 9 mg/Kg) por via intraperitoneal (i.p.). Os reflexos corneano e de retirada da pata foram testados para assegurar a anestesia.

Após indução anestésica foi realizada a tricotomia da região da calota craniana, realizando-se então uma incisão sagital para expô-la. Seguindo as coordenadas estereotáticas de Paxinos (2013), foi identificado o ponto de acesso ao córtex motor (2,3 médio-lateral; 1,2 anteroposterior; 0,4 dorsoventral), procedendo-se o acesso pontual com broca odontológica n° 7.

Os animais dos grupos com isquemia receberam uma injeção de 40 pmoles do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (ET-1 – Sigma Aldrich) diluídos em 1µl de solução salina (NaCl, 0,9%) estéril. Os demais receberam volume igual de salina estéril.

Após a cirurgia os animais foram retornados ao alojamento de animais, mantidos em gaiolas adequadas com água e comida à vontade.

### 3.4 Tratamento Pós-cirúrgico

O tratamento pós-cirúrgico foi realizado em duas etapas, adaptado de Ekdahl *et al.* (2003). A primeira, iniciada 2 horas após o procedimento cirúrgico, compreendeu 4 administrações com intervalos de 12 horas entre elas. A segunda etapa, iniciada 24 horas após o término da anterior, foi constituída por 5 administrações com intervalos de 24 horas entre elas. A via de administração eleita foi a intraperitoneal (0,01mL/100g de massa corpórea).

Os grupos tratados receberam minociclina (Sigma Aldrich) 50mg/kg na primeira etapa e 25 mg/kg na segunda. Os grupos controle receberam salina (NaCl, 09%) estéril em todo o tratamento.

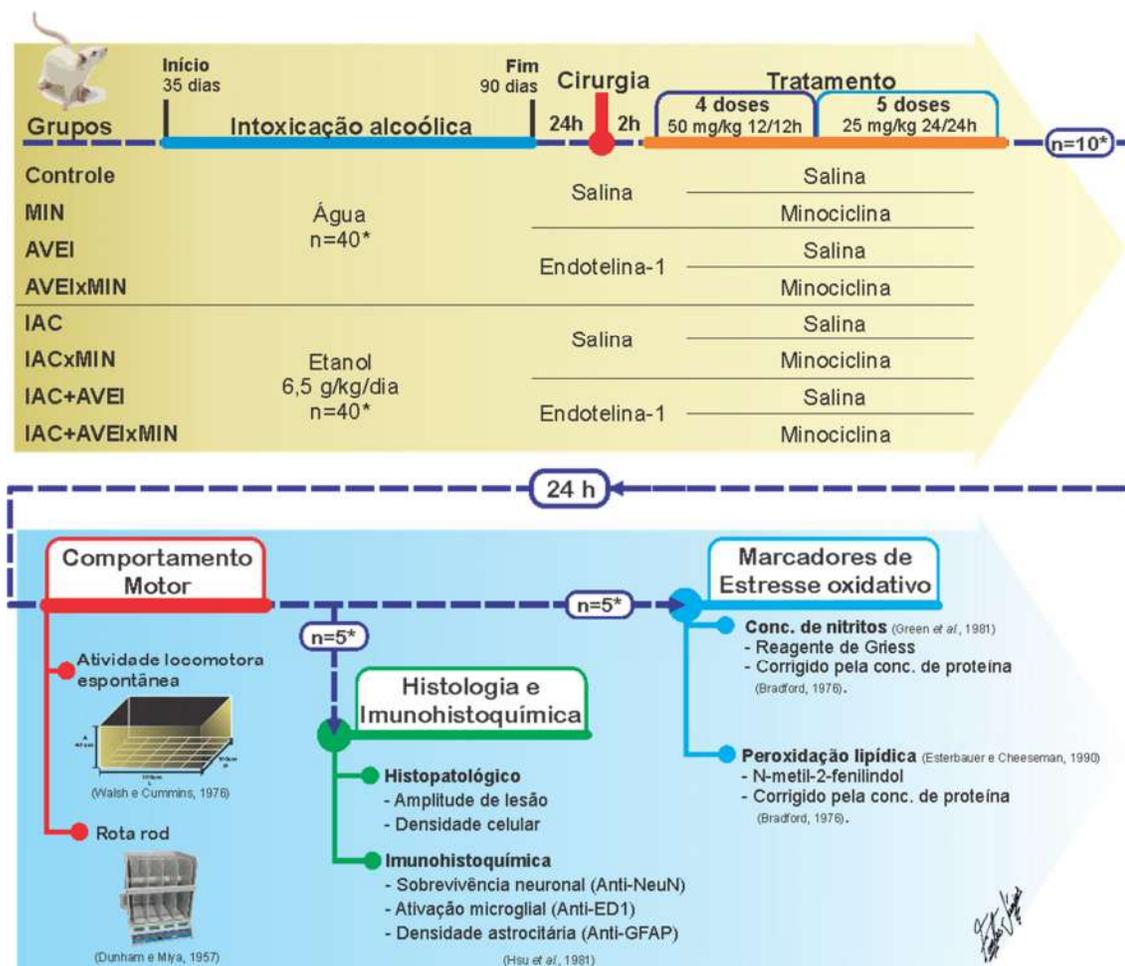


Figura 4 – Representação esquemática do desenho experimental. \*por grupo

### 3.5 Ensaios comportamentais

Os experimentos comportamentais foram realizados 24 h após o término do tratamento com minociclina, sendo os animais conduzidos à sala de testes com pelo menos uma hora de antecedência para aclimação e habituação.

O ambiente experimental possuía atenuação de níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação (120 lux), sendo os testes executados entre as 8 e 12 h, com o objetivo de evitar as variações circadianas que poderiam interferir com os resultados experimentais.

### 3.5.1 Atividade locomotora espontânea

Para realização do teste foi utilizada uma arena quadrilátera em madeira (LxPxA de 100x100x40cm), revestida com material não permeável e base dividida em 25 quadrantes de 20x20 cm (Figura 3).

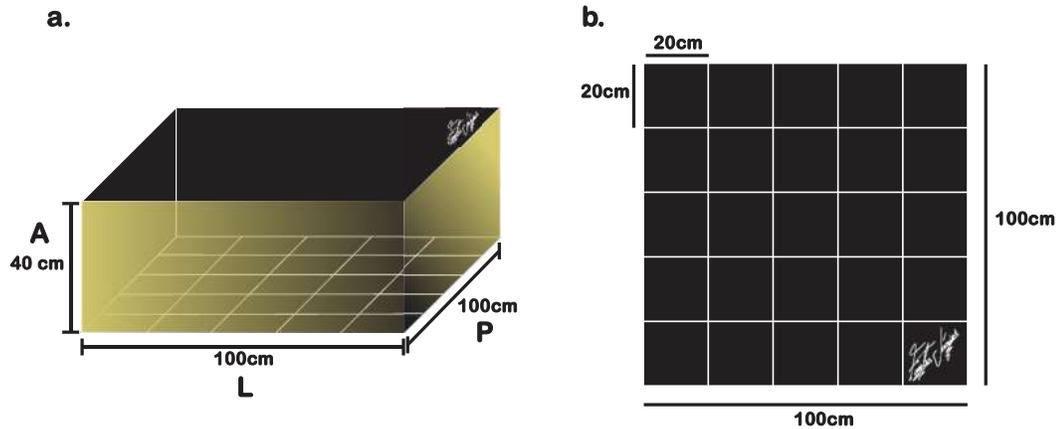


Figura 5 – Arena utilizada no teste de atividade locomotora espontânea em visão perspectiva (a) e superior (b).

O experimento foi iniciado com o posicionamento do animal no quadrante central da arena, sendo permitido o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos. A avaliação da capacidade motora foi baseada nos indicadores propostos por Walsh e Cummins (1976) e Pandolfo *et al.* (2007):

- Tempo despendido para sair do ponto de partida;
- Frequência do comportamento de levantar-se (*rearing*);
- Número de quadrantes totais cruzados (locomoção total).

Não foi considerada locomoção o ato de colocar uma, duas ou três patas em um dos quadrantes, com retorno ao quadrante original.

Os testes foram registrados por filmadora fixada acima da arena e monitorada em outra sala pelo experimentador que não sabia o grupo de tratamento que estava sendo testado.



### 3.6 Ensaios histopatológicos e imunohistoquímica

#### 3.6.1 Perfusão e preparo de lâminas

Após a realização dos testes comportamentais, os animais destinados para análises histopatológicas e imunohistoquímicas foram anestesiados (cloridrato de cetamina 90 mg/kg e cloridrato de xilazina 9 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina (NaCl 0.9%) heparinizada, seguida de paraformaldeído a 4% (em tampão fosfato 0,2M – pH 7,4)

Após a perfusão dos animais, os cérebros foram removidos da caixa craniana, pós-fixados no mesmo fixador usado na perfusão por 12h e crioprotetidos em soluções com concentrações crescentes de sacarose (100, 200 e 300 g/L, em solução de glicerina 10% v/v). Os cérebros foram então embebidos em *Tissuetek* e congelados em câmara de criostato, com efeito Peltier (-55°C – Carl Zeiss, Mícron, Alemanha).

Secções coronais de 20 µm e 50µm de espessura foram obtidas para análise imunohistoquímica e visualização da área de lesão, respectivamente. Todas as secções foram montadas diretamente em lâminas gelatinizadas durante a microtomia, com exceção das lâminas para histoquímica que foram coletadas *free-floating*.

Para aumento da aderência das secções, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 24 h. Após este período, as mesmas foram conservadas à temperatura de -20°C.

#### 3.6.2 Avaliação histopatológica

Os padrões teciduais foram avaliados por microscopia óptica, nas secções de 50µm de espessura coradas em violeta de cresila, sendo avaliadas a formação e amplitude de lesão isquêmica característica e a densidade celular (número de células/mm<sup>2</sup>).

### 3.6.3 Marcação imunohistoquímica

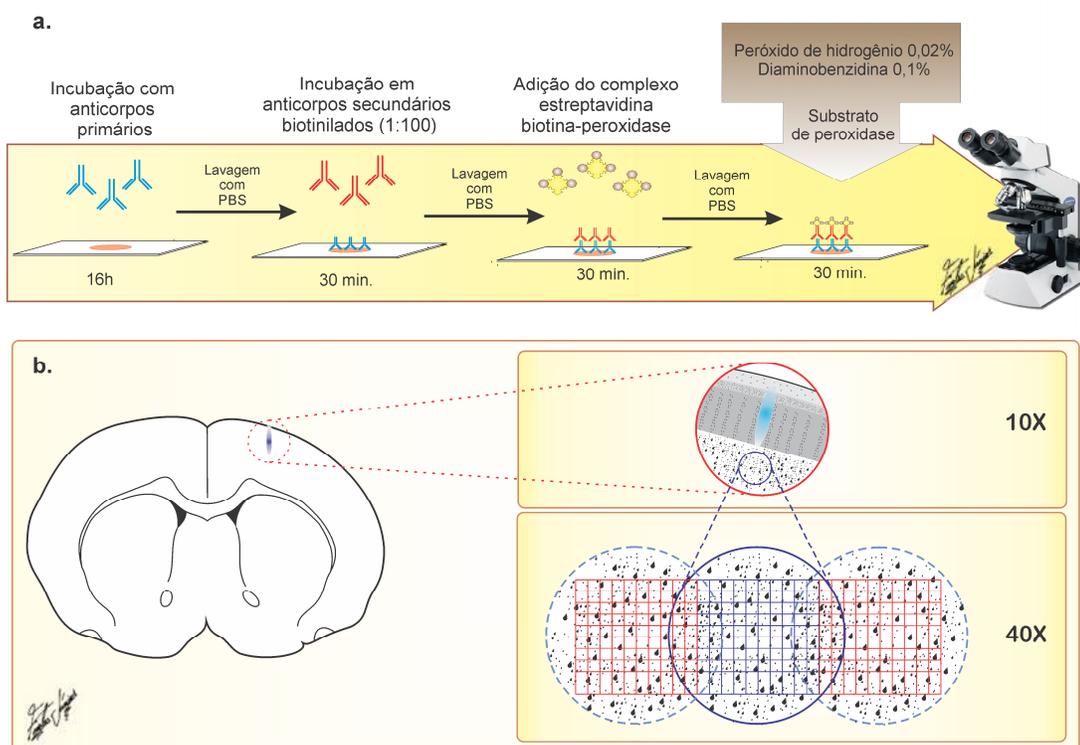
Para a marcação imuno-histoquímica foi seguido o protocolo proposto por Hsu *et al.* (1981). Na primeira etapa, as secções de 20 µm, já montadas em lamínas, foram submetidas a pré-tratamento com tampão borato (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,2M – pH 9,0). Na segunda, foram imersas em solução de metanol + peróxido de hidrogênio a 1% por 20 minutos e circundadas com caneta hidrofóbica. Ao final de cada etapa, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M + NaCl 0,9% – pH 7,4).

A seguir as secções foram incubadas com solução de bloqueio (soro do animal que produziu o anticorpo primário a 10%) por uma hora. O excesso de soro foi então retirado e os cortes histológicos seguiram incubação por período de 16 h em câmara úmida (4°C) com os anticorpos primários descritos na tabela 2.

Anticorpo primário	Fabricante	Diluição	Alvo
Anti-NeuN	Chemicon	1:100	Proteína nuclear específica de neurônios. Marcador para corpos neurais, revela as condições de densidade/sobrevivência neuronal.
Anti-ED1	Serotec	1:500	Antígenos expressos nas membranas de fagolisossomos, sendo a quantidade de antígeno expresso relacionada à atividade fagocítica. Destina-se à identificação da presença/atividade de macrófagos e micróglia ativados.
Anti-GFAP	Dako	1:2000	Proteína fibrilar ácida glial, uma subunidade dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular de astrócitos.

**Tabela 2** – Descrição dos anticorpos primários destinados a imunohistoquímica.

Após lavagens, os cortes foram incubados por 30 minutos com anticorpo secundário biotilado (Vector) na diluição de 1:100. Após novas lavagens, foi realizada então a aplicação do conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase (Novocastra) por 30 minutos. Por fim, foi aplicada solução substrato de peroxidase (peróxido de hidrogênio a 0,02% com diaminobenzidina a 0,1% em salina tamponada) (figura 5a).



**Figura 7** – Preparo das lâminas para avaliação histológica mediante marcação imunohistoquímica (a.) e padronização de leitura com uso de gradícula (b.).

Todas as secções foram inspeccionadas em microscópio óptico, no qual foi avaliada a presença de corpos celulares marcados positivamente para os anticorpos utilizados. Imagens contendo os campos mais ilustrativos foram capturadas com auxílio de uma máquina fotográfica digital acoplada ao fotomicroscópio. A análise quantitativa das marcações imunohistoquímicas foi feita com auxílio de uma gradícula de contagem de 0,00625 mm<sup>2</sup> acoplada a uma das oculares ocular, em objetiva 40x. Para cada secção foram contados campos representativos da amostra, como demonstrado na figura 5b.

### 3.7 Ensaios de avaliação do estresse oxidativo

#### 3.7.1 Preparo das amostras

Após a avaliação comportamental, os animais destinados a análise bioquímica foram sacrificados, procedendo-se então a coleta dos tecidos para análise (córtex cerebral). O tecido

extraído foi lavado em soro fisiológico e submetido a congelamento com nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenado em -80 °C.

Para as análises, as amostras foram descongeladas e ressuspendidas em Tris-HCl (20 mM, pH 7,4, a 4 °C), por disgregação sônica (concentração aproximada de 1 g de tecido/mL).

### 3.7.2 Avaliação dos níveis de nitritos

Para esta determinação uma alíquota do lisado foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi separado em alíquotas destinadas a determinação dos nitritos e da concentração de proteínas.

A concentração de nitritos foi determinada com base na reação destes com o reagente de Griess (Naftil-etileno-diamina 0,1% e Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% - 1:1). Esta reação forma compostos azoicos, que atribuem coloração azulada característica. A intensidade do azul é proporcional a concentração do cromógeno, sendo verificado por leitura espectrofotométrica (Green *et al.*, 1981).

Cem microlitros do sobrenadante ou soluções padrões de nitrito de sódio foram adicionados a 100µL do reagente de Griess, em placa de 96 poços, e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente. Depois, foi realizada a leitura da absorbância ( $\lambda = 550\text{nm}$ ). A concentração de nitritos foi calculada a partir da curva padrão e corrigida pela quantidade de proteínas totais de cada amostra (quantificada como descrito abaixo). Finalmente, os resultados foram expressos como percentual do grupo controle.

### 3.7.3 Ensaio de Peroxidação Lipídica

O nível de peroxidação lipídica foi determinado através do método proposto por Esterbauer e Cheeseman (1990), baseado na reação dos metabólitos de ácidos graxos poli-insaturados, malonaldeído (MDA) e 4-hidroxicenos (4-HA), com o N-metil-2-fenilindol (NMFI). Esta reação, em presença de ácido metanosulfônico, produz um cromóforo estável,

cuja coloração é proporcional à concentração de lipídios oxidados, podendo ser mensurado por espectrofotometria.

Para tanto, uma alíquota do lisado foi centrifugada a 5600 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante separado em alíquotas destinadas a determinação da peroxidação lipídica e da concentração de proteínas.

A 325 µL de NMFI (10,3mM) diluído em metanol (1:3) e 75 µL de ácido metanosulfônico foram adicionados 100 µL das soluções padrões de MDA ou das amostras. Depois essa mistura foi aquecida a 45° C por 40 minutos. Após este período, foi realizada a leitura da absorbância ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ). A concentração de MDA foi calculada a partir da curva padrão e corrigida pela quantidade de proteínas totais de cada amostra (quantificada como descrito abaixo). Finalmente, os resultados foram expressos como percentual do grupo controle.

#### 3.7.4 Concentração de proteína

Para esta análise foi utilizado o método proposto por Bradford (1976), onde 100µL da amostra de tecido são misturados com 100 µL do reagente de Bradford em vortex. A concentração de proteína será medida espectrofotometricamente ( $\lambda=595\text{nm}$ ) e os resultados expressos como mg de proteínas. Soluções de concentrações conhecidas de albumina bovina serão utilizadas como padrão.

### 3.8 Análise estatística

Inicialmente a normalidade dos grupos foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Como a distribuição dos dados foi normal, os grupos foram analisados por teste t de student ou Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguido do teste Bonferroni. Em todos os casos, foi considerado um valor significativo de  $P < 0,05$ .

Os dados de cada grupo experimental foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $M \pm E.P.M.$ ) de 10 animais para os protocolos comportamentais, 5 animais para a histoquímica e imunohistoquímica e 5 animais para as análises relacionadas ao estresse oxidativo.

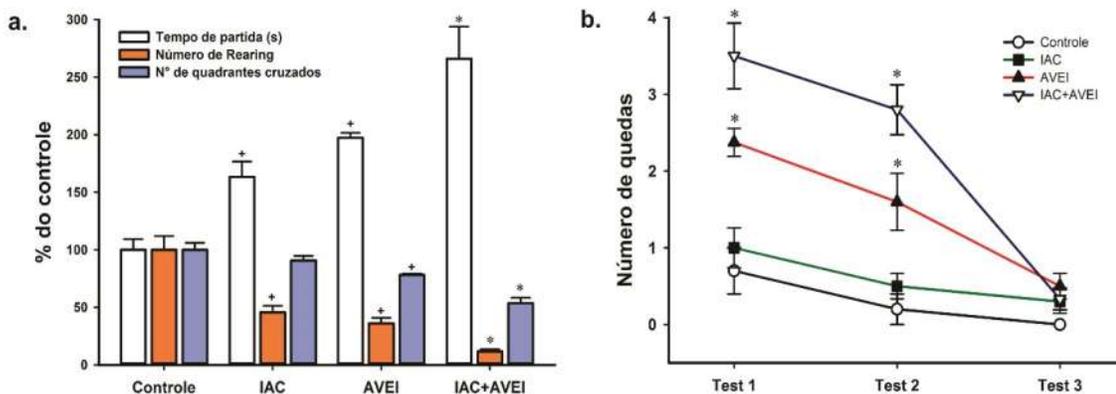
## 4 Resultados

### 4.1 Efeitos da intoxicação alcoólica crônica sobre o dano induzido por isquemia focal

#### 4.1.1 Avaliação do comportamento motor

Nos ratos submetidos a isquemia focal houve uma elevação de 97,36% no tempo para início da deambulação, redução de 66,41% no número de *rearing* e de 21,93% na deambulação total dos animais (medida como número de quadrantes cruzados) no teste do campo aberto, quando comparados aos do grupo controle (figura 8a). O AVEI também elevou o número de quedas no rota rod, em relação ao controle, nos dois primeiros ciclos de teste (1° ciclo: número de quedas de  $2,37 \pm 0,18$  e  $0,70 \pm 0,30$ , respectivamente / 2° ciclo: número de quedas de  $1,60 \pm 0,37$  e  $0,20 \pm 0,20$ , respectivamente – Figura 8b).

O tratamento com etanol não promoveu redução significativa sobre a deambulação, mas elevou em 63,5% o tempo para o início da locomoção e reduziu em 54,42% o número de elevações (Figura 8a). No rota rod, os animais submetidos a IAC comportaram-se semelhante ao grupo controle (Figura 8b).



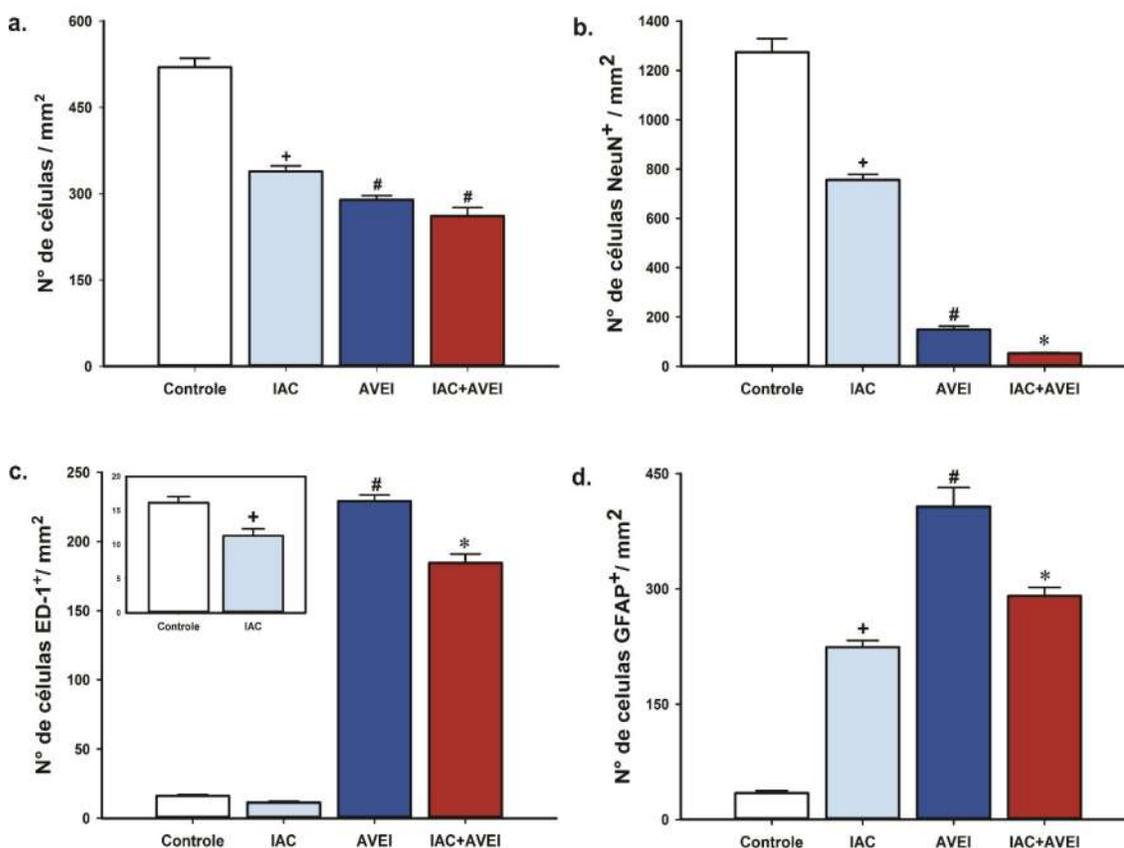
**Figura 8** – Efeitos da Isquemia focal (AVEI) e/ou da intoxicação alcoólica crônica (IAC) sobre a (a.) atividade locomotora espontânea e (b.) número de quedas no teste do rota rod. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=10). \*P<0,05 versus todos os grupos; +P<0,05 versus grupo Controle.

Quando o AVEI foi precedido de IAC, todos os parâmetros foram agravados, quando comparados ao grupo AVEI, com elevação de 35% no tempo de imobilidade no início do experimento, redução de 61% no número de *rearing* e redução de 31% no número de quadrantes cruzados (Figura 8a). No teste do rota rod o número de quedas também foi significativamente maior que no grupo AVEI nos dois primeiros testes ( $3,50 \pm 0,43$  e  $2,80 \pm 0,33$  – Figura 8b).

#### 4.1.2 Avaliação histológica e imunohistoquímica

Tanto a IAC e AVEI isoladamente quanto a comorbidade geraram lesões expressivas no córtex motor de ratos (ver Anexo II), traduzindo-se quantitativamente como uma redução no número de células por  $\text{mm}^2$  (de 34,85%, 44,26% e 48,6%, respectivamente) em relação ao controle em lâminas coradas com violeta de cresila (figura 9a).

Nos ensaios de imuno marcação, o grupo AVEI apresentou redução de 88,30% no número de células NeuN+ e aumentos muito significativos do número de células ED1+ e GFAP+, quando comparados ao controle. O grupo IAC apresentou redução de 40,64% do número de células NeuN+ e aumento de 549% do número de células GFAP+, mas com redução de 30% do número de células ED-1+ (figura 9 e anexos III e IV).

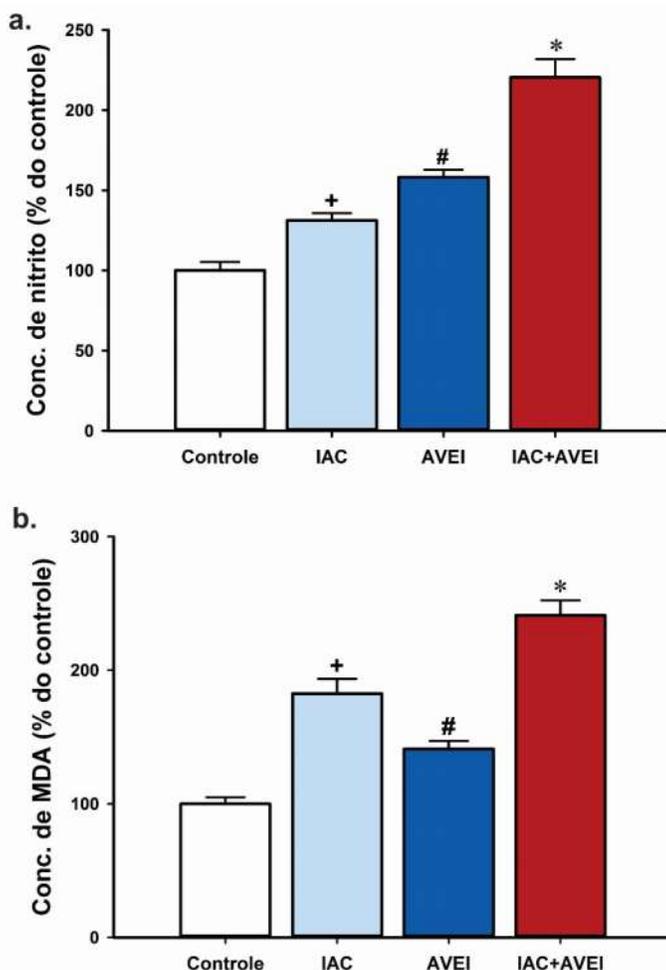


**Figura 9** – Efeitos da isquemia focal (AVEI) e/ou da intoxicação alcoólica crônica (IAC) sobre (a.) a densidade de células analisadas por coloração com violeta de cresila e o número de células (b.) NeuN+, (c.) ED-1+ e (d.) GFAP+ do córtex motor. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=5). \*P<0,05 versus todos os grupos; +P<0,05 versus grupo Controle; # versus grupos IAC e Controle.

No grupo onde o AVEI foi precedido de IAC, houve maior dano tecidual (Anexo II) com a maior redução do número de células coradas com violeta de cresila e células marcadas com anticorpo Anti-NeuN. As elevações no número de células ED-1+ e GFAP+ foram menos expressivas do que no grupo AVEI (Figura 9).

#### 4.1.3 Avaliação do estresse oxidativo

Todos os tipos de insultos aumentaram significativamente os níveis de nitritos e a peroxidação lipídica do córtex cerebral de rato (figura 10), alcançando-se os valores máximos com a IAC seguida de AVEI. Interessantemente, a IAC de forma isolada provocou menores níveis de nitritos, mas maiores níveis de peroxidação lipídica que a isquemia (figura 10).

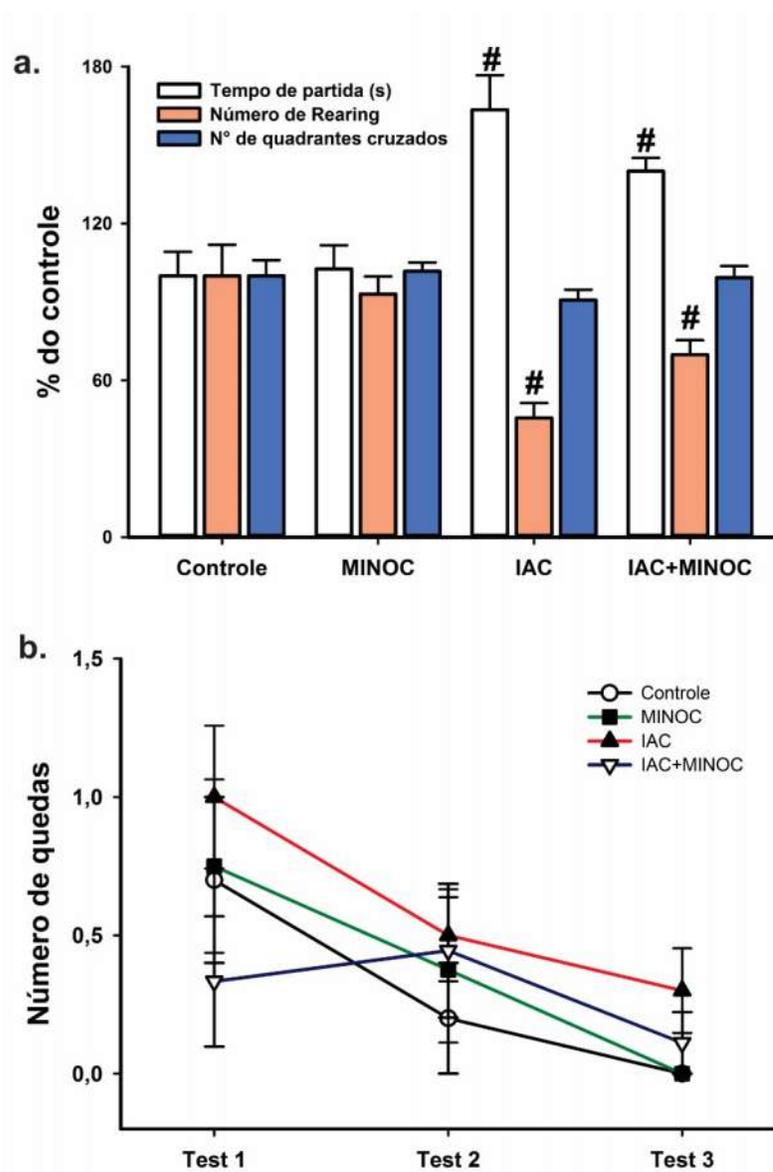


**Figura 10** – Efeitos da isquemia focal (AVEI) e/ou da intoxicação alcoólica crônica (IAC) sobre as concentrações de (a.) nitrito e (b.) malonaldeído (MDA) por miligrama de proteína em córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=5). \*P<0,05 versus os grupos; +p<0,05 versus grupo controle; #P<0,05 versus grupo IAC e controle.

## 4.2 Efeitos da minociclina sobre o desfecho da IAC

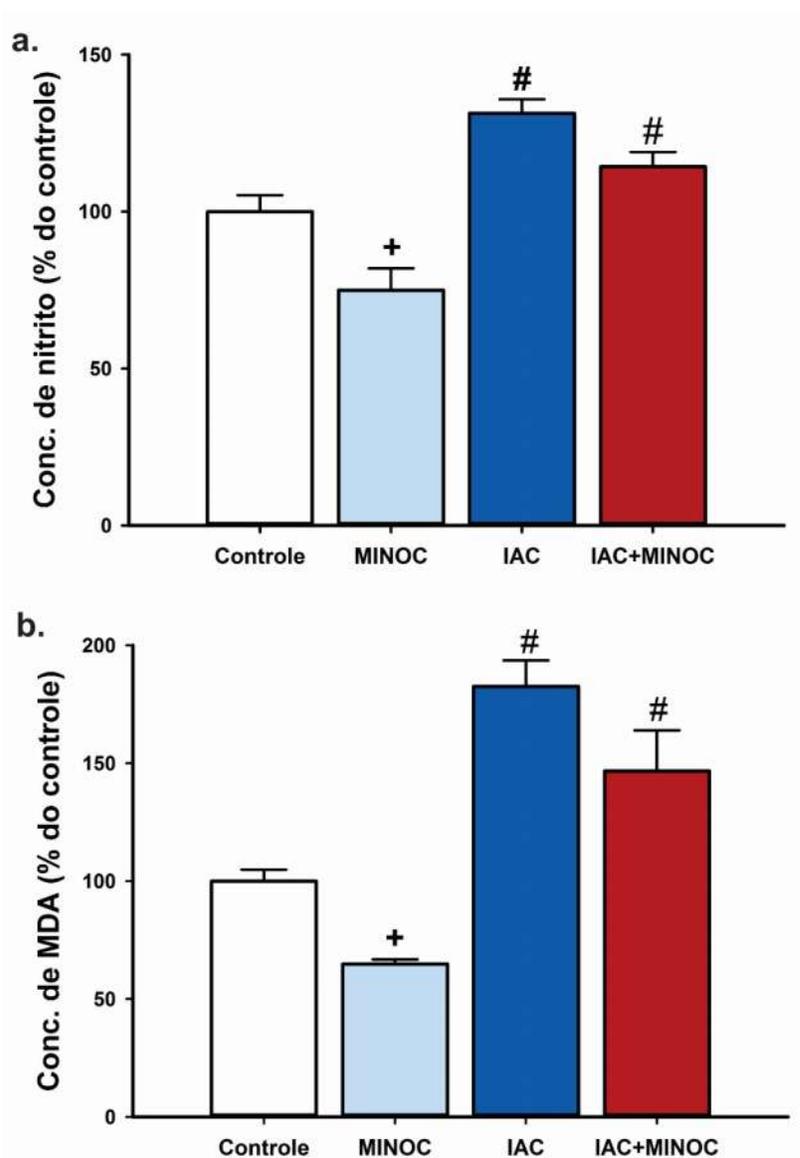
### 4.2.1 Avaliação do comportamento motor

Nos ratos submetidos a IAC, o tratamento com minociclina não modificou significativamente o desfecho do comportamento motor, persistindo a elevação no tempo para início da locomoção e a redução no número de elevações, em comparação com o grupo controle (Figura 11a). No teste do rota rod não foram observadas alterações significativas (Figura 11b).



**Figura 11** – Efeitos da intoxicação alcoólica crônica (IAC) e/ou da minociclina sobre a (a.) atividade locomotora espontânea e (b.) número de quedas no teste do rota rod. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=10). #P<0,05 versus grupos Controle e MINOC.

O tratamento com minociclina em animais sadios (grupo MINOC) reduziu significativamente as concentrações de nitritos e MDA em relação ao grupo controle. O mesmo tratamento, no entanto, quando aplicado aos animais submetidos a IAC, não promoveu alterações significativas nos níveis destes marcadores em relação ao grupo IAC (Figura 12).

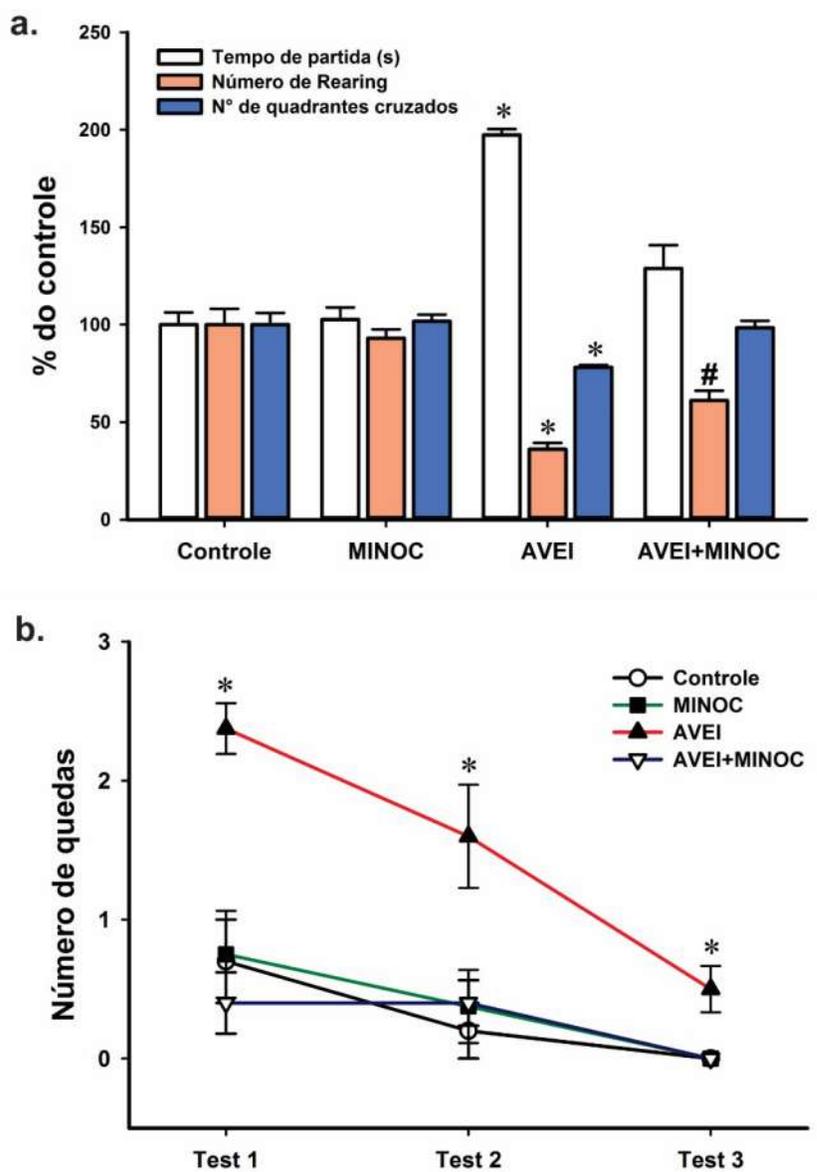


**Figura 12** – Efeitos da da intoxicação alcoólica crônica (IAC) e/ou do tratamento com minociclina sobre as concentrações de (a.) nitritos e (b.) malonaldeído (MDA) por miligrama de proteína em córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=5). +p<0,05 versus grupo controle; #P<0,05 versus grupos Controle e MINOC.

### 4.3 Efeitos da minociclina sobre a isquemia focal

#### 4.3.1 Avaliação do comportamento motor

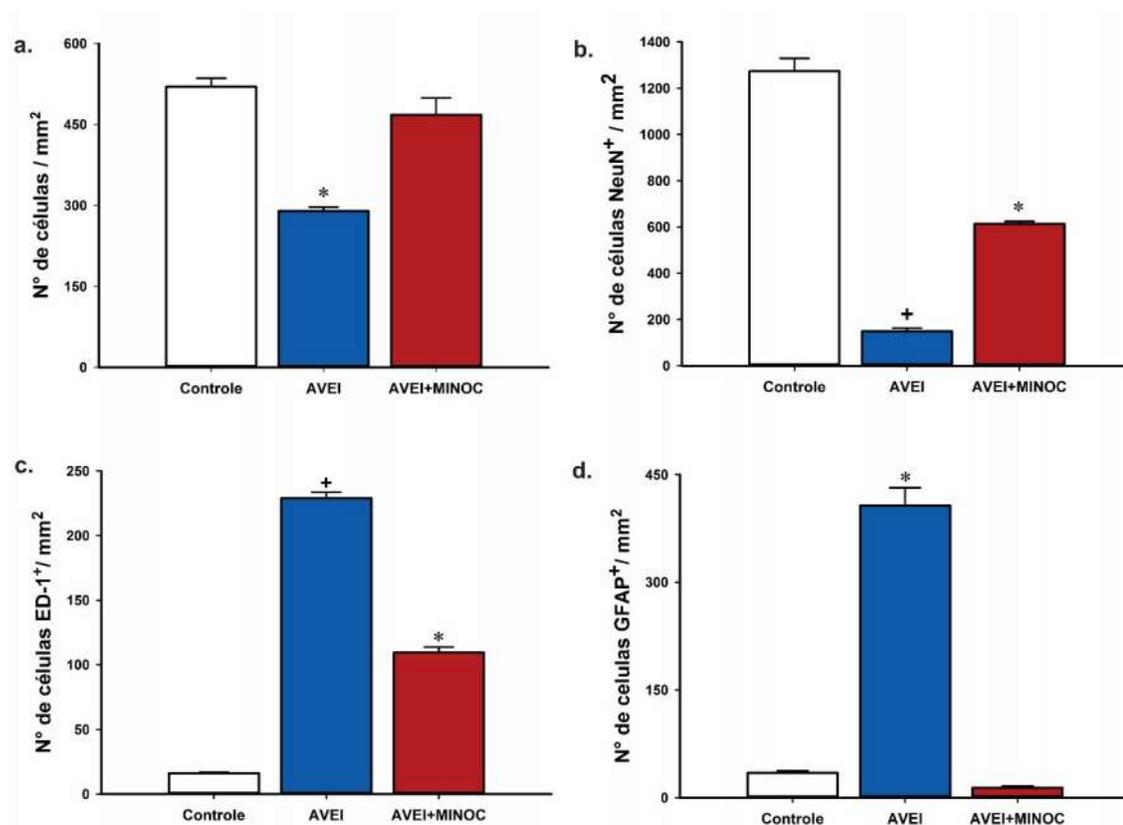
O tratamento com minociclina inibiu as perdas motoras induzidas pela isquemia no córtex motor em todos os parâmetros avaliados, com exceção do número de rearing. O número elevações é significativamente maior do que o observado no grupo AVEI, mas não alcançou o patamar do grupo Controle (Figura 13).



**Figura 13** – Efeitos da Isquemia focal (AVEI) e/ou do tratamento com minociclina sobre a (a.) atividade locomotora espontânea e (b.) número de quedas no teste do rota rod. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=10). \*P<0,05 versus todos os grupos; #P<0,05 versus grupos Controle e MINOC.

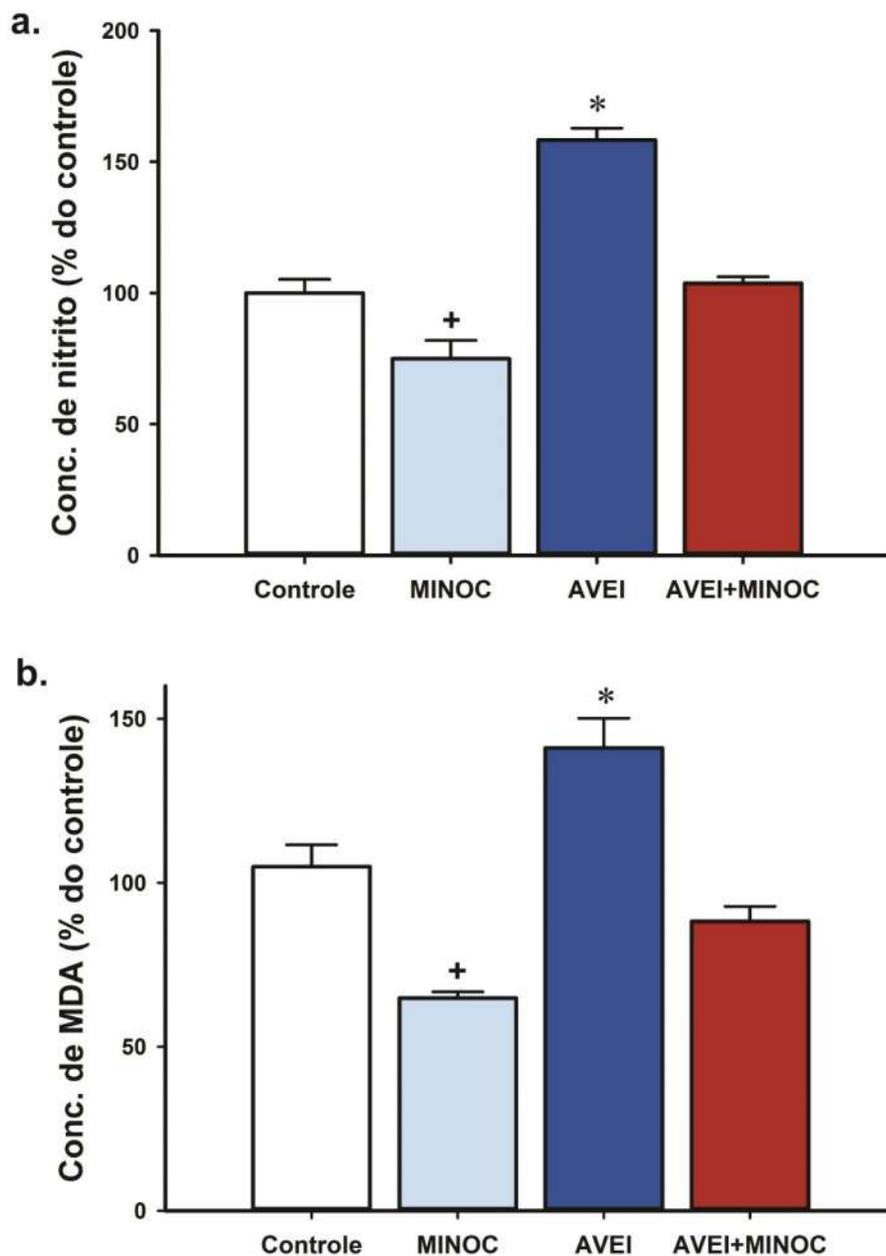
## 4.3.2 Avaliação histológica e imunohistoquímica

Os animais submetidos a isquemia focal e em seguida tratados com minociclina apresentaram significativa redução do dano tecidual, bem como da perda do número total células e de neurônios, quando comparados àqueles do grupo AVEI (Figura 14a e b – anexos II e III). A minociclina Inibiu também o aumento do número de células GFAP+, alcançando valores semelhantes ao controle, e parcialmente de células ED-1+ (Figura 14c e d – anexo IV)



**Figura 14** – Efeitos da Isquemia focal (AVEI) e/ou do tratamento com minociclina sobre (a.) a densidade de células analisadas por coloração com violeta de cresila e o número de células (b.) NeuN+, (c.) ED-1+ e (d.) GFAP+ do córtex motor. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=5). \*P<0,05 versus todos os grupos; +P<0,05 versus grupo Controle.

O tratamento dos animais submetidos a isquemia focal com minociclina inibiu o aumento das concentrações de nitritos e produtos da peroxidação lipídica, em comparação com o grupo AVEI, com valores semelhantes aos controles (Figura 15).

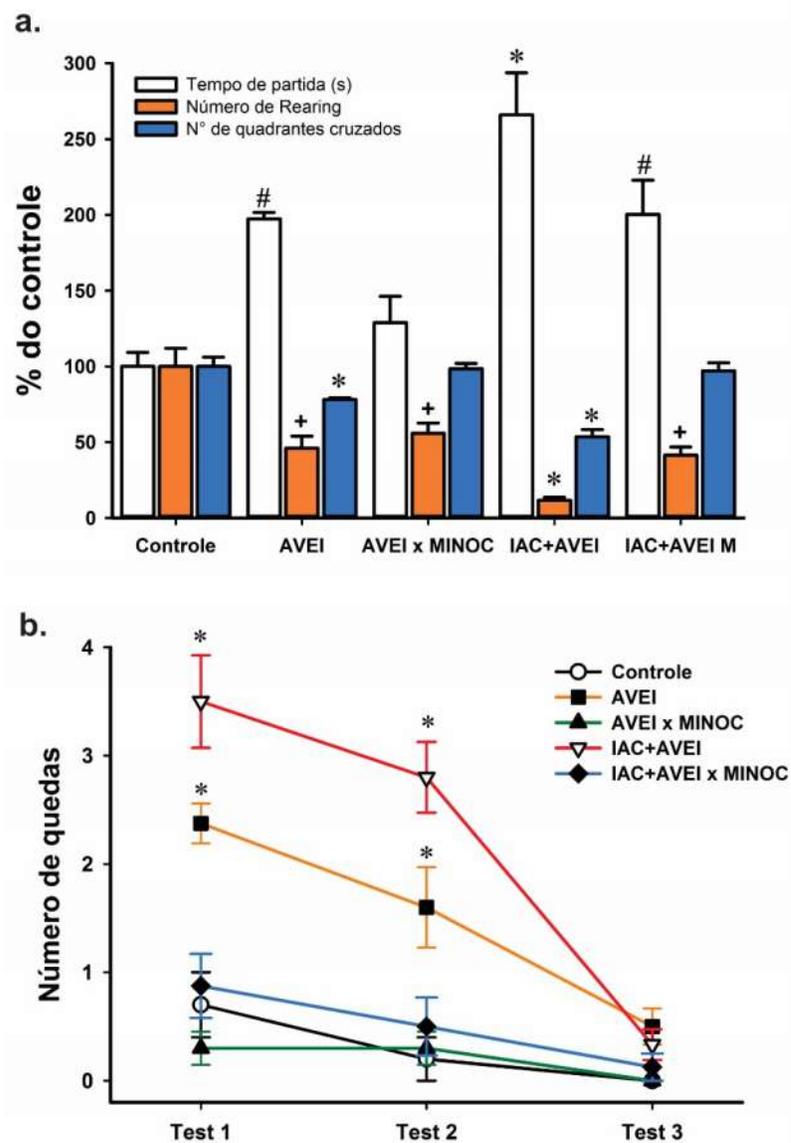


**Figura 15** – Efeitos da Isquemia focal (AVEI) e/ou do tratamento com minociclina sobre as concentrações de (a.) nitritos e (b.) malonaldeído (MDA) por miligrama de proteína em córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=5). \*P<0,05 versus todos os grupos; +p<0,05 versus grupos controle e AVEIxMONOC.

#### 4.4 Efeitos da minociclina sobre a isquemia focal precedida de IAC

##### 4.4.1 Avaliação do comportamento motor

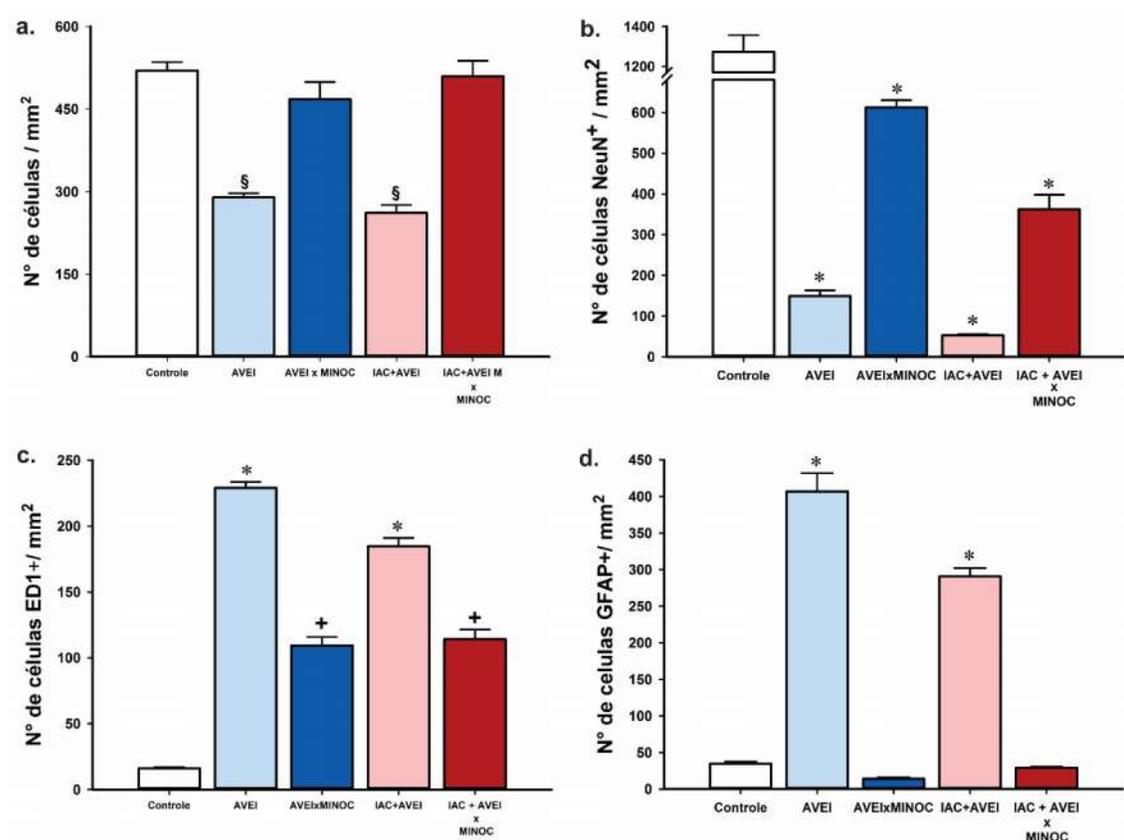
Quando tratados com minociclina, os animais em que a isquemia focal foi precedida de IAC apresentaram melhoras significativas em todos os parâmetros comportamentais em relação aos animais do grupo IAC+AVEI (figura 16). Apesar de que o IAC agravou os efeitos do AVEI, a minociclina foi capaz de reverter completamente a diminuição da deambulação (número de quadrantes cruzados) e o aumento das quedas no rotarod.



**Figura 16** – Efeitos da Isquemia focal (AVEI), da Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC) e/ou do tratamento com minociclina sobre a (a.) atividade locomotora espontânea e (b.) número de quedas no teste do rota rod. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=10). \*P<0,05 versus todos os grupos; +p<0,05 versus grupos controle; #P<0,05 versus grupos Controle e AVEIxMINOC.

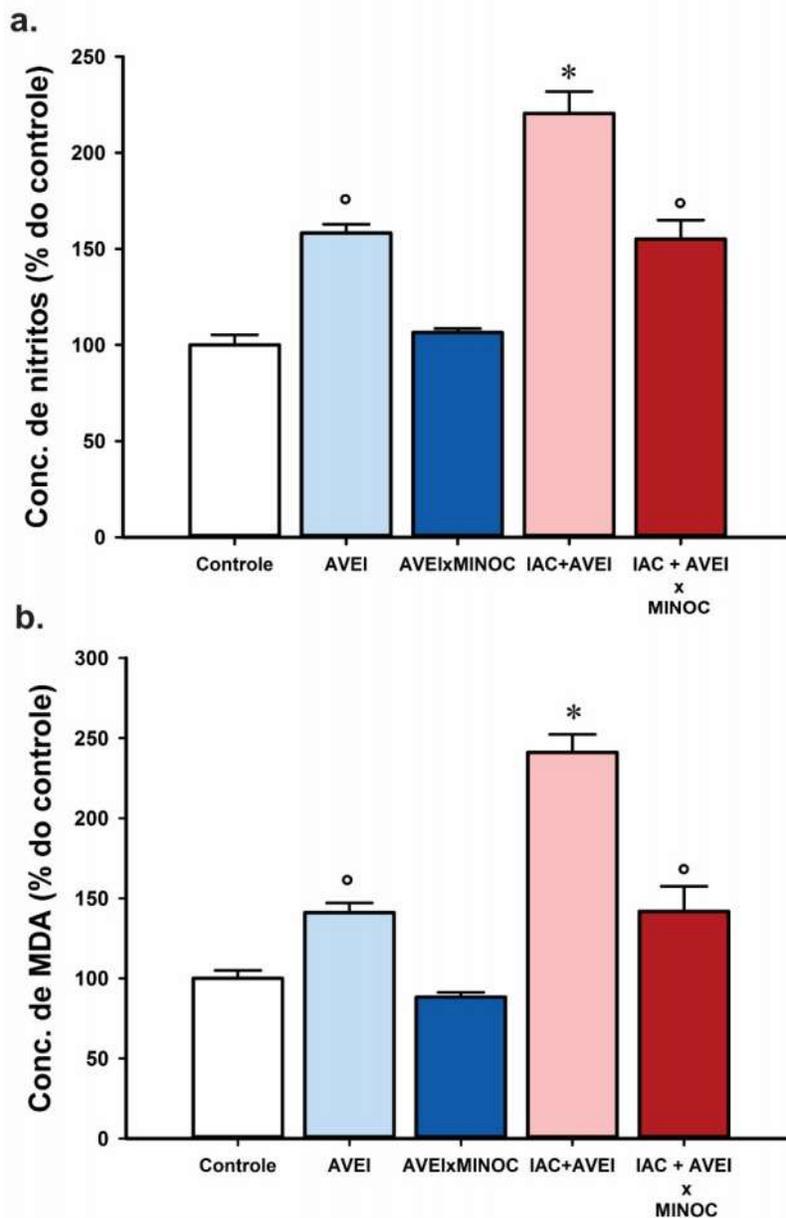
#### 4.4.2 Avaliação histológica e imunohistoquímica

O tratamento com minociclina nos animais IAC+AVEI foi também capaz de reverter as perdas do número total de células e do número de neurônios NeuN+, de forma completa ou parcial, respectivamente (Figura 17a e b – anexos II e III). Interessantemente, este fármaco eliminou totalmente a ativação astrocitária (GFAP+) provocada pela comorbidade e ainda reduziu significativamente a ativação microglial (ED1+) no córtex cerebral (figura 17d e c – anexo 4).



**Figura 17** – Efeitos da Isquemia focal (AVEI), da Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC) e/ou do tratamento com minociclina sobre (a.) a densidade de células analisadas por coloração com violeta de cresila e o número de células (b.) NeuN+, (c.) ED-1+ e (d.) GFAP+ do córtex motor. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=5). \*P<0,05 versus todos os grupos; +P<0,05 versus grupo Controle; § P<0,05 versus grupos Controle, AVEI x MINOC e IAC+AVEI x MINOC.

A minociclina foi capaz de diminuir significativamente os efeitos sinérgicos entre a IAC e a isquemia sobre o nível de nitritos e os níveis de peroxidação lipídica (Figura 18), demonstrando a eficácia dela como potente protetor antioxidante.



**Figura 18** – Efeitos da Isquemia focal (AVEI), da Intoxicação Alcoólica Crônica (IAC) e/ou do tratamento com minociclina sobre as concentrações de (a.) nitrito e (b.) malonaldeído (MDA) por miligrama de proteína em córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M (n=5). \*P<0,05 *versus* todos os grupos; °p<0,05 *versus* grupo controle e AVEIxMIN.

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que os marcantes distúrbios motores em diferentes tarefas comportamentais induzidos pela interação entre intoxicação crônica com etanol e o dano isquêmico no córtex motor de ratos resulta em importantes alterações teciduais e perda neuronal grave. Demonstra também que a intoxicação alcoólica crônica limita a ativação microglial e astrocitária desencadeada pelo processo isquêmico, mas desenvolve com este um potente sinergismo sobre o estresse oxidativo. É pioneiro também em evidenciar que, apesar da efetividade da minociclina na prevenção das perdas motoras e celulares induzidas pela isquemia cortical, o histórico prévio de administração crônica de etanol prejudica a atuação desta, possivelmente exigindo ajustes na terapêutica.

O modelo experimental de intoxicação alcoólica crônica utilizado neste trabalho (fêmeas e ingestão regular pesada – iniciada na adolescência e seguindo até a idade adulta) busca acompanhar um padrão em destaque na população humana. Em avaliação da evolução do consumo de etanol no Brasil, no período de 2006-2012, observou-se que o maior aumento no consumo ocorreu no grupo das mulheres (I.N.P.A.D., 2013).

A puberdade se mostra uma etapa de elevada sensibilidade aos efeitos de drogas psicotrópicas, tanto à neurodegeneração quanto ao desenvolvimento de dependência. A redução das sinapses dopaminérgicas no núcleo acumbente tem sido amplamente relacionada com a tendência a comportamentos de risco durante a adolescência, incluindo a introdução ao consumo de drogas (Giedd, 1999; Sisk e Foster, 2004; Doremus-Fitzwater *et al.*, 2010; Selemon, 2013; Toumbourou *et al.*, 2014).

Estudos epidemiológicos descrevem ainda um início precoce do consumo durante o tempo de vida, estabelecendo-se como um hábito em quase 13% da população com idade de 12-17 anos (S.M.A., 2013). Traduzimos este aspecto em nosso modelo iniciando a intoxicação alcoólica aos 35 dias de nascimento dos ratos, período que marca o início da puberdade nesta espécie (30 a 40 dias pós natal para fêmeas – Ojeda e Skinner (2006), também se enquadrando no período equivalente ao início da adolescência. A faixa entre 25 e 42 dias de nascimentos para os ratos é equiparada a idade entre 10 e 18 anos em humanos (Spear, 2015).

Cerca de 65% dos indivíduos iniciados ao etilismo na adolescência apresentam um comportamento de consumo de bebidas alcoólicas em um padrão episódico (caracterizado pela ingestão de doses elevadas em intervalos curtos de tempo, geralmente nos fins de semana – *Binge drinking*) ou pesado (consumo frequente de 5 doses padrão de etanol ou mais – *Heavy drinking*) (S.M.A., 2013; N.I.A.A.A., 2015). De fato, não há um consenso mundial sobre o que seria uma dose padrão de etanol, variando de 12 a 14 g de etanol entre os órgãos de saúde ao redor do mundo (W.H.O., 2010; S.E.N.A.D., 2011; N.I.A.A.A., 2015). Considerando estas características, a posologia adotada para o presente estudo se enquadra em um padrão de consumo pesado, visto que, aplicando transposição alométrica baseada na superfície corporal (F.D.A., 2006), verificamos que a dose de 6,5 g/kg/dia para rato corresponde a uma dose em torno de 1,003 g/kg/dia para seres humanos (cerca de 5 a 6 doses padrões/dia).

Embora este padrão de consumo pesado seja apontado epidemiologicamente como fator de risco independente para a ocorrência e a letalidade do acidente vascular cerebral (Otero Palleiro e Barbagelata Lopez, 2007), há ainda uma lacuna na literatura científica concernente ao tipo de interferência mútua existente entre a IAC e a isquemia cerebral, assim como a seus mecanismos ou consequências.

A fim de trazer luz sobre esta incógnita, modelamos uma isquemia focal induzida por endotelina-1, um peptídeo de 21 aminoácidos, que promove intensa vasoconstrição. Este efeito é mediado por um receptor acoplado a proteína  $G_{\alpha q}$  denominado  $ET_A$ , expresso principalmente na musculatura vascular e cardíaca (Rubanyi e Polokoff, 1994). A injeção deste peptídeo no tecido cerebral produz constrição tanto de artérias cerebrais de médio e grande calibre quanto da microcirculação, induzindo lesão isquêmica proporcional à dose, com o mínimo de edema (Yanagisawa *et al.*, 1988; Fortes *et al.*, 1989; Ziv *et al.*, 1992).

Embora a ação sobre receptores de células não vasculares (*e.g.* neurónios e células da glia) seja apontada como possível limitação neste modelo, o padrão de redução do fluxo sanguíneo provocado (rápido, mas não imediato) com reperfusão várias horas depois, fornece um modelo representativo dos sinais clínicos do AVEI em humanos (Frost *et al.*, 2006; Kleim *et al.*, 2007; Nguemeni *et al.*, 2015). Além disso, o seu efeito focal, permite o estudo dos efeitos da isquemia em regiões específicas do cérebro (Moyanova *et al.*, 2007; Roome *et al.*, 2014).

No nosso modelo, o córtex motor como local para indução da isquemia focal foi selecionado com base nas principais manifestações clínicas presentes no desfecho do AVEI. O comprometimento motor está presente em até 42% dos sobreviventes incluindo grande ocorrência de alteração de movimentos voluntários, intimamente associados à função cortical. Este percentual se eleva para 50% em pacientes maiores de 65 anos (Welmer *et al.*, 2006; Alaverdashvili e Whishaw, 2008; Wissel *et al.*, 2013; Go *et al.*, 2014; Yilmaz *et al.*, 2014).

Este desfecho clínico pode ser drasticamente modificado pela intervenção farmacológica. Cabe, no entanto, destacar que o tratamento do AVEI é um quadro emergencial dependente do tempo, ou seja, sua efetividade está diretamente relacionada à celeridade no início da medicação. As diretrizes clínicas nacionais recomendam o início do tratamento em até 60 minutos após a crise aguda, havendo demonstrações de efetividade se iniciado em até três horas. Após este período há progressiva redução de seus benefícios (Oliveira-Filho *et al.*, 2012). Assim, neste trabalho o tratamento foi iniciado 2 horas após a indução isquêmica e mantido por sete dias, tempo correspondente à fase aguda do AVEI (S.B.D.C., 2001).

As doses foram inicialmente consideradas com base em estudos prévios que demonstraram efetividade de doses moderadas (45 a 90 mg/kg/dia) de minociclina em modelos de neurodegeneração em roedores (Li *et al.*, 2013). Analisando então o tempo de tratamento e as doses efetivas, foi adaptado o protocolo utilizado por Ekdahl *et al.* (2003), que em seu estudo demonstrou efetividade da minociclina no tratamento de um processo neuroinflamatório.

#### 5.1 A intoxicação crônica por etanol iniciada na adolescência modifica os efeitos deletérios induzidos pela isquemia

Nossos resultados demonstraram que a exposição a doses elevadas de etanol por 55 dias desde a adolescência agrava o desfecho motor pós isquemia focal em ratos (figura 7). Este quadro foi acompanhado de importantes alterações histológicas (figura 8) e potencialização do estresse oxidativo (figura 9) no córtex motor.

Isoladamente, a isquemia focal no córtex motor promoveu redução da capacidade de iniciar a locomoção, da exploração vertical e horizontal dos animais, denotando uma redução global da capacidade de locomoção (figura 7a). Adicionalmente, os animais submetidos a isquemia focal apresentaram proeminente incapacidade de manter-se sobre o cilindro giratório nos dois primeiros tempos de teste no rota rod (figura 7b), revelando uma importante comprometimento da coordenação, equilíbrio e aprendizado motor.

Cabe lembrar que estamos olhando para um ponto de corte, sete dias após o evento isquêmico, e por isso tais manifestações podem indicar prejuízo de áreas sensório-motoras e/ou dos circuitos neuronais corticais-subcorticais, em consequência da expansão do núcleo isquêmico e da penumbra isquêmica ao longo dos sete dias transcorridos desde o infarto. Uma consequência direta desta ocorrência seria o prejuízo da integração do córtex motor com o estriado e cerebelo (Middleton e Strick, 2002; Nguemeni *et al.*, 2015).

Ainda, nossos resultados confirmam estudos anteriores que apontavam prejuízos motores em animais submetidos a isquemia focal por injeção estereotáxica de ET-1 e por bloqueio da artéria cerebral média (Yousuf *et al.*, 2010; Mestriner *et al.*, 2013). Esses dados também explicariam os achados clínicos, que destacam a ocorrência de paresia, espasticidade, dificuldades e incapacidades motoras como manifestações mais frequentes nos sobreviventes a quadros de AVEI (Welmer *et al.*, 2006; Lundstrom *et al.*, 2008; Go *et al.*, 2014; Yilmaz *et al.*, 2014).

A intoxicação alcoólica crônica (IAC) também apresentou como desfecho comportamental a redução da capacidade de iniciar movimentos e prejuízo da exploração vertical (figura 6a). Apesar de não detectarmos diferenças significativas na exploração horizontal em campo aberto e na estabilidade sobre o cilindro giratório, foi observada uma redução da média do número de quadrantes cruzados (exploração horizontal) em relação ao controle, bem como uma elevação das médias dos três ciclos de teste no rota rod, que deverão ser confirmadas em estudos posteriores.

Apesar de que nossos animais com IAC podem estar desenvolvendo uma possível síndrome de abstinência, consideramos esse fato um valor adicional do nosso desenho experimental pois reflete a realidade do paciente alcoólatra internado em hospital após AVEI.

A avaliação do comportamento motor dos animais submetidos a IAC seguido de isquemia focal produziram resultados mais desfavoráveis do que os observados nos grupos AVEI ou IAC isoladamente (figura 6), demonstrando um sinergismo claro entre os agravos sobre os parâmetros comportamentais. Os prejuízos sobre a latência para o surgimento de locomoção, a atividade locomotora horizontal e vertical mostraram-se potencializados na ocorrência de comorbidade (figura 6a). Além disso, houve também um aumento significativo do número de quedas no teste do rota rod (figura 6b).

Como descrito no desenho experimental, a injeção com ET-1 ocorreu 24 horas após o término da IAC (figura 2). Em um estudo recente, (Teixeira *et al.*, 2014), foi avaliado isoladamente o efeito do etanol mas nesta mesma janela de tempo, i. é, 24 horas após o término da IAC (6,5 g/kg/dia por 55 dias). Foram então encontradas redução significativa (22%) da deambulação no teste do campo aberto, menor tolerância a elevação angular no plano inclinado e redução da latência para queda no teste do rota rod. Interessantemente, confrontando nossos achados com este estudo, podemos concluir que o surto isquêmico é induzido em um contexto motor já significativamente alterado pelo etanol, podendo constituir o ponto de partida para o sinergismo na comorbidade.

Os prejuízos na capacidade de iniciar a locomoção, bem como na execução do movimento, podem indicar alterações em outras áreas para além do córtex motor (*e.g.* estriado e cerebelo), associadas com o padrão difuso de neurodegeneração induzida pelo etanol. De fato, o etanol afeta diferentes áreas do encéfalo, podendo gerar degeneração cerebelar, que decursa com o desenvolvimento de ataxia severa (Zeigler *et al.*, 2005; De La Monte e Kril, 2014). O agravamento dos parâmetros motores podem então ser compreendidos como uma associação dos efeitos globais da IAC com os prejuízos sobre os circuitos cortico-subcorticais associados ao dano isquêmico no córtex motor (Middleton e Strick, 2002; Nguemeni *et al.*, 2015). Assim, o presente trabalho abre todo um leque de novas perspectivas e apoia a realização de estudos mais aprofundados sobre a comorbidade.

Ainda, subjacente ao do déficit motor, observou-se uma redução de 40,64% no número de células NeuN+ no córtex motor dos animais submetidos a IAC (figura 7b), avaliados 7 dias após o término do período de intoxicação. A mesma imunomarcção em córtex motor, realizada 24 horas após o término da IAC (Teixeira *et al.*, 2014), revelou um padrão de perda neuronal em torno de 40%. Neste contexto, nossos resultados revelam que a

neurodegeneração observada após sete dias de abstinência seria majoritariamente herança do período de IAC.

A indução isquêmica, isoladamente, promoveu um elevado nível de neurodegeneração (perda de 88,30% no número de células NeuN+ – figura 7b), acompanhando os dados da literatura, que demonstram um período de elevada neurodegeneração nos sete dias subsequentes ao infarto tecidual, com pico nas primeiras 24 horas (Nguemeni *et al.*, 2015). A conjugação das duas variáveis (IAC+AVEI) resultou em perda adicional de corpos neuronais, apoiando assim a hipótese de que o sinergismo observado nas alterações comportamentais envolve um importante componente neurodegenerativo (figura 7b).

Diversos mecanismos já foram propostos para explicar a neurodegeneração induzida por intoxicação alcoólica, dos quais vários pontos coincidem com aqueles associados à lesão isquêmica. Entre eles, a ativação da micróglia tem sido implicada como um elemento chave no estabelecimento de quadro de neuroinflamação em animais tratados com etanol (dose inicial de 5 g/kg, seguida por doses de 3 g/kg a cada 8h, alternado 4 dias de intoxicação com 3 dias de abstinência) por 25 dias (Zhao *et al.*, 2013). Alguns pesquisadores, por outro lado, defendem a tese de que a ativação microglial seria uma consequência e não a causa da neurotoxicidade do etanol (Marshall *et al.*, 2013).

Pascual *et al.* (2007) evidenciou a participação de mecanismos inflamatórios nos prejuízos motores gerados pelo etanol (3 g/kg/dia – i.p.) em ratos adolescentes. Em seu modelo o tratamento alternava dois dias de intoxicação e dois dias de abstinência por um período de duas semanas. O desencadeamento deste evento tem sido correlacionado a capacidade do etanol de promover a ativação de receptores tipo Toll (TLR2, TLR3 e TLR4) (Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2009; Qin e Crews, 2012a), com consequente indução da expressão do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e aumento da expressão de mediadores inflamatórios, como a COX-2, iNOS, TNF-α, IL-1β, IL-6, entre outros (Valles *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2007; Crews e Nixon, 2009; Alfonso-Loeches *et al.*, 2010).

Interessantemente, nossos resultados demonstram uma redução na ativação microglial, avaliada pela redução no número de células ED1+, no grupo de animais submetidos a IAC, que se torna estatisticamente significativa quando são comparados isoladamente os grupos controle e IAC (Figura 7c, inserto). Considerando a possibilidade de os 7 dias de

abstinência de nosso desenho experimental estar influenciando para esses resultados diferenciados, verificamos que em estudo prévio foi observada redução na densidade microglial (células IBA1+) em animais submetidos ao mesmo modelo de IAC, mas sacrificados 24 h após a administração da última dose (Teixeira *et al.*, 2014).

Em adição, Valles *et al.* (2004) demonstraram que o tratamento crônico com etanol promove a elevação de mediadores inflamatório (iNOS, COX-2 e IL-1 $\beta$ ) no córtex cerebral de ratas e em cultura de astrócitos, sem no entanto induzir ativação microglial. Conjuntamente esses dados apontam para a hipótese de que a intoxicação alcoólica interfere na proliferação e/ou ativação microglial.

Cabe destacar as diferenças entre nosso modelo e aqueles associados à microgliose (Pascual *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2013), considerando que se tratavam de modelos de intoxicação intermitente (*Binge drinking like*), apesar de haver grande variação nas doses e intervalos de intoxicação e abstinência. Tal observação sugere uma diferença de efeito sobre a micróglia em modelos de *binge* ou consumo contínuo. Em harmonia com esta hipótese, Riikonen *et al.* (2002) demonstraram que o tratamento intermitente com etanol (3 g/kg/dia, alternando 2 dias de intoxicação com 1 dia de abstinência por 40 dias) promove efeitos diferentes do tratamento contínuo sobre a micróglia no tecido cerebelar. Enquanto a intoxicação intermitente gerou microgliose, o mesmo não aconteceu no uso contínuo da mesma dose pelo mesmo período.

Junto à redução da atividade microglial, encontramos também uma expressiva astrogliose sete dias após o término da IAC. Quando avaliado 24 horas após o término da IAC, no entanto, foi observada uma redução da densidade astrocitária (Teixeira *et al.*, 2014). Conjuntamente estes dados sugerem que o aumento do número de células GFAP+, encontrado em nosso estudo, seria uma consequência do período de abstinência ao álcool. Em harmonia com esta hipótese, um estudo anterior demonstrou uma redução do número de astrócitos em ratos submetidos a IAC por 60 dias, com ocorrência de astrogliose após três dias de abstinência (Miguel-Hidalgo, 2006).

Um pouco diferente do que ocorreu nos animais submetidos a IAC, no grupo AVEI o aumento da densidade astrocitária foi acompanhada de intensa ativação microglial (Figura 7c e d). O dano isquêmico é descrito como um quadro tipicamente marcado pela rápida ativação

e recrutamento de células microgliais e astrócitos para o local da lesão (Lai e Todd, 2006). Neste caso, o mecanismo também parece desencadear-se via TLR's, com consequente aumento a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios, fatores quimiotáticos e recrutamento de leucócitos da circulação compondo o processo neuroinflamatório (Teixeira *et al.*, 2014).

Surpreendentemente, no grupo em que o AVEI foi precedido pela IAC, revelou-se uma interação peculiar. O córtex motor destes animais apresentou uma ativação microglial inferior a daqueles submetidos exclusivamente a isquemia focal. Partindo do efeito observado no grupo submetido exclusivamente a IAC (redução do número de células ED1+), é razoável sugerir que o saldo da comorbidade resulta das alterações promovidas pelo etanol sobre a população microglial. De aí, a importância do estudo dessas complexas comorbidades tão comumente encontradas na clínica.

De fato, interessantes descobertas sobre a relação do etanol com as células gliais têm surgido recentemente, apontando possíveis caminhos para a compreensão dos fenômenos observados neste trabalho. Recentemente foi demonstrado que a exposição ao etanol durante a adolescência promove proliferação microglial generalizada no hipocampo, acompanhada de transformação morfológica deste grupo de células (Mcclain *et al.*, 2011).

Este novo estado, denominado de ativação parcial, não desenvolve atividade fagocítica nem expressa ED1, persistindo por longos períodos após o término da IAC. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, esta última observação poderia explicar, pelo menos em parte, a redução das células ED1+ nos grupos tratados com etanol durante a adolescência. Adicionalmente, devemos considerar as evidências de que a IAC promova uma redução na população microglial (Teixeira *et al.*, 2014).

O impacto destes achados sobre o processo patológico no evento de comorbidade se ratifica no fato de que estas alterações na ativação de células da glia podem resultar em prevenção parcial da resposta ao AVEI (Figura 8c). Embora mais estudos sejam necessários para confirmar essa hipótese, uma certa ação neuroprotetora da micróglia também já foi relatada em estados de abstinência ao álcool (Zhao *et al.*, 2013) (quadro este último que está presente em pacientes alcoólatras que são hospitalizados pela ocorrência de um AVEI).

De forma semelhante ao observado com relação a micróglia, os animais onde a isquemia focal foi precedida de IAC apresentaram menor densidade astrocitária no córtex motor, quando comparados ao grupo AVEI. Cabe ressaltar, no entanto, que esta densidade é superior a encontrada no grupo IAC, revelando que a isquemia focal eleva a astrogliose associada ao quadro de abstinência (figura 7d), mas é limitada pela degeneração astrocitária induzida pelo etanol (Teixeira *et al.*, 2014).

O fenômeno da astrogliose, marcado pelo aumento da proliferação e reatividade dos astrócitos, possui um papel relevante na limitação dos danos associados a isquemia focal. A recuperação espontânea após a isquemia (Clarkson *et al.*, 2013) está diretamente relacionada a constituição de uma cicatriz astrogliar, formada pelo acúmulo destas células na região perinuclear, impedindo a sua expansão (Wanner *et al.*, 2013). A redução da população astrocitária induzida pela IAC poderia, portanto, prejudicar a evolução do processo isquêmico, retardando ou fragilizando a formação da cicatriz glial, impactando a neurodegeneração na região de penumbra e o desfecho comportamental (Ding, 2014; Li *et al.*, 2014).

Junto ao processo neuroinflamatório e às mudanças tróficas e morfológicas do sistema neuroimune, um outro mecanismo importante no complexo de neurodegeneração presentes tanto da IAC quanto na isquemia cerebral, é o estresse oxidativo. Diversos estudos têm demonstrado um importante componente oxidativo nas variadas modalidades de intoxicação alcoólica. Em contrapartida, ao etanol têm sido atribuídos vários mecanismos associados a indução de estresse oxidativo, com formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's – *e.g.*  $O_2^-$ ;  $OH\cdot$ ;  $H_2O_2$  e peróxidos lipídicos) e de Nitrogênio (ERN's – *e.g.* NO e ácidos e derivados peroxinítricos), peroxidação e fragmentação de macromoléculas, dano mitocondrial e neurodegeneração (Collins e Neafsey, 2012).

O primeiro e mais direto mecanismo está associado a modulação da via glutamatérgica, recordando que o etanol é um inibidor desta via. No entanto, a inibição persistente conduz a uma supregulação de receptores de glutamato, que em períodos de abstinência desenvolvem um quadro de hiperatividade e conseqüente excitotoxicidade. Há então, entre outros eventos, uma elevação na produção ERO's e ERN's pela quebra do equilíbrio citosólico do cálcio (Hardingham, 2009).

O etanol também é capaz de elevar a atividade da NADPH-oxidase (NOX), complexo de proteína responsável pela “queima respiratória” (*respiratory burst*) em células fagocíticas, com geração de grandes quantidades de espécies reativas, principalmente radicais superóxido (Qin e Crews, 2012b). Outros mecanismos que tem sido implicados neste processo são a potencialização da atividade da fosfolipase A2 (PLA2), levando a oxidação, peroxidação e epoxidação de ácidos graxos (Brown *et al.*, 2009); a oxidação da cyp 2E1, produzindo ERO's e radicais hidroxietila; e a interferência nos mecanismos de remoção das ERO's/ERN's, junto com a depleção dos antioxidantes endógenos (Davis e Syapin, 2004; Haorah *et al.*, 2008; Ou *et al.*, 2010; Collins e Neafsey, 2012; Qin e Crews, 2012b).

Em nossos experimentos a IAC promoveu uma expressiva elevação nas concentrações de nitritos (aumento de 31,29% *versus* controle – figura 8a) no córtex motor, bem como da peroxidação lipídica (POL), evidenciada pelo aumento da concentração da malonaleído (aumento de 82,5% *versus* controle – figura 8b), recordando que foram medidos sete dias após a última dose de etanol. Quando avaliados estes mesmos parâmetros 24 horas após o término da IAC, foi observada concentrações ainda maiores de nitritos (aumento de 70% *versus* controle), mas com padrão de peroxidação lipídica semelhante (aumento de 80% *versus* controle) (Teixeira *et al.*, 2014). A manutenção dos níveis de MDA, mesmo diante da queda na concentração de nitrito evidencia que esta ERN não seria a única envolvida no processo de POL, mas contaria também com os excessos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> e HO<sup>\*</sup> e indução enzimáticas (*e.g.* NOX e PLA2) gerados tanto na IAC quanto na abstinência (Hsieh e Kinsella, 1989; Collins e Neafsey, 2012).

A lesão isquêmica também é marcada por um importante componente oxidativo. Mais agudamente desencadeado pela excitotoxicidade glutamatérgica, decorre da ativação de inúmeras enzimas moduladas pela concentração de cálcio, produzindo um excesso de espécies reativas, com destaque para o aumento da atividade da nNOS (Yoo *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2014).

Mais tardiamente, os níveis de NO são reforçados pela indução da iNOS, importante no processo neurodegenerativo na região de penumbra (Iadecola, 1997). Em conjunto com estes mecanismos, ocorre o aumento da produção de ERO's de radicais superóxido por ação da Xantina oxidase (OX) e da NOX, principalmente em leucócitos e células gliais (Hu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011).

Nossos dados também evidenciaram que a isquemia focal eleva as concentrações de nitritos (aumento de 58,28% *versus* controle – figura 8a) e a peroxidação lipídica (aumento de 41,1% *versus* controle – figura 8b). Um resultado inédito é que, apesar de que o aumento do nível de nitritos foi menor no grupo com IAC quando comparado ao grupo com isquemia, o nível de peroxidação lipídica foi maior.

No grupo exposto às duas condições mórbidas a formação destes marcadores foi claramente potencializada (aumentos de 120,48% e 141,09% nas concentrações de nitritos e MDA, respectivamente – figura 8), representando um claro, e acreditamos, mais importante mecanismo fundamental para a potencialização dos déficits motores e neurodegeneração na interação entre o alcoolismo crônico e acidente vascular cerebral.

## 5.2 Diferenças de sensibilidade à ação da minociclina na isquemia e na IAC.

A administração intraperitoneal de minociclina, iniciada 2h após a indução de isquemia focal, foi efetiva em prevenir/reverter ou atenuar os prejuízos motores e teciduais observados no grupo AVEI. Após o tratamento com minociclina, a exploração horizontal, a capacidade de iniciar movimentos, bem como a estabilidade sobre o cilindro em movimento dos animais que sofreram isquemia apresentaram-se semelhantes aos animais controle, havendo também redução dos prejuízos sobre a exploração vertical (figura 11).

A estas observações, se soma o fato de o tratamento com minociclina por 7 dias em animais sadios não ter promovido nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais avaliados em relação ao controle (figura 11), o que apoia a escassa presença de efeitos colaterais deletérios com a dose usada. Esses resultados complementam dados prévios que já apontavam para o efeito terapêutico da minociclina na avaliação comportamental (Oliveira *et al.*, 2014).

O presente trabalho também demonstrou que os parâmetros tempo de início da locomoção e número de *rearings* são os mais sensíveis ao efeito deletério da isquemia e ao efeito terapêutico da minociclina, no teste do campo aberto, ressaltando a relevância deles para o estudo com esse modelo (Figura 11a).

Também no teste de rotarod, ficaram bem evidentes ambos os efeitos (deletério da isquemia e terapêutico da minociclina) no número de quedas (Figura 11b), confirmando os efeitos encontrados na latência para a queda em estudo prévio (Oliveira *et al.*, 2014).

Apesar das significativas alterações provocadas pela isquemia nos parâmetros imunohistoquímicos, sete dias de tratamento com minociclina foram suficientes para impedir/reverter completamente (no caso do número total de células e da ativação astrocitária) ou parcialmente (para o número de células NeuN+ e a ativação microglial) os efeitos desse grave insulto. Esses dados são confirmados na avaliação com violeta de cresila onde é possível notar uma redução expressiva da perda celular e desarranjo tecidual com o tratamento com minociclina (figura 12a – anexo II).

Cabe destacar também o potente efeito que a minociclina desempenhou sobre o estresse oxidativo incitado pela isquemia. Apesar dos elevados níveis de nitritos e peroxidação lipídica encontrados no córtex cerebral 7 dias após o evento isquêmico, o tratamento com minociclina foi capaz de prevenir ou reverter completamente esses efeitos (figura 13). Interessantemente, o efeito antioxidante da minociclina é notado inclusive nos animais saudáveis, onde os parâmetros avaliados (concentração de nitritos e MDA) foram potentemente reduzidos em relação ao controle (figura 13).

Embora o mecanismo pelo qual a minociclina promove estes benefícios ainda permaneça obscuro, o primeiro e mais amplamente estudado foi sua propriedade de inibir a ativação microglial (Yrjanheikki *et al.*, 1999; Yong *et al.*, 2004; Hayakawa *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2013). É atualmente conhecido, no entanto, que a micróglia pode desenvolver pelo menos dois tipos distintos de ativação, denominadas M1, relacionada ao desenvolvimento da neuroinflamação, e M2, a quem se tem atribuído atividade neuroprotetora. A ativação para a forma M1 está ligada ao aumento da atividade de NFκB, com consequente aumento na expressão do fator de necrose tumoral-α, interleucinas-1β, interferon-γ, COX-2/prostaglandinas e iNOS/NO (Kigerl *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2012). Ainda se desconhece o meio pelo qual a minociclina inibe a ativação da micróglia, mas já se sabe que esta ação é direta e seletivamente para forma M1, reduzindo também a expressão da NFκB e a produção dos mediadores inflamatórios (Kobayashi *et al.*, 2013).

Outro alvo de sua ação é a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), uma endopeptidase dependente de zinco associada a lise de praticamente todas as proteínas estruturais da matriz extra-celular (*e.g* fatores de coagulação, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento, receptores de superfície e moléculas de adesão) (Sternlicht e Werb, 2001). No processo isquêmico há uma forte indução da expressão de MMP-9, sendo liberada por neurônios, células microgliais e astrócitos reativos (Lakhan *et al.*, 2009), estando associada ao agravo do processo excitotóxico, danos neuronais e morte celular, além da “quebra” da barreira hematoencefálica (Lee *et al.*, 2004; Copin *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006). Diversos estudos têm demonstrado uma redução na atividade da MMP-9, com conseqüente redução da área de lesão e perda neuronal (Sapadin e Fleischmajer, 2006; Chen *et al.*, 2013).

A minociclina também interfere no mecanismo de estresse oxidativo, tanto por reduzir a liberação de ERO's pelas células quanto por ação do tipo *scavenger* direta e específica para peroxinitritos, de potência equivalente a do alfa-tocoferol (Kraus *et al.*, 2005; Schildknecht *et al.*, 2011). Adicionalmente, a minociclina reduz a liberação de fatores de apoptose (*e.g*. caspase 9 e 3, fator de apoptose induzido e SMAC/Diablo) e eleva as concentrações do fator anti-apoptótico Bcl-2 (Wang *et al.*, 2003; Scarabelli *et al.*, 2004).

Para melhor compreendermos a inter-relação entre a comorbidade e o tratamento com a minociclina, torna-se necessário esclarecer primeiramente o papel deste fármaco em uma situação de IAC, visto que este apresenta vários mecanismos lesivos em comum com o AVEI. Apesar do potencial neuroprotetor deste fármaco, até o presente momento somente dois outros grupos de pesquisa exploraram esta temática.

Em um deles, Agrawal *et al.* (2011), mostraram que o tratamento com minociclina reduz o consumo espontâneo de etanol em camundongos. Um segundo estudo, conduzido por Wu *et al.* (2011), demonstrou que a administração prévia de minociclina reduz a sedação de camundongos que receberam 2,5 a 4,5 g/kg de etanol em dose única. Adicionalmente, o estudo evidenciou que a minociclina piorou o desempenho motor dos animais alcoolizados.

Nosso trabalho é, portanto, pioneiro em demonstrar os efeitos desta droga sobre o desfecho da IAC durante a adolescência. A minociclina, quando administrada durante os sete dias que sucederam a última dose de etanol, promoveu melhora da exploração horizontal,

bem como da acomodação sobre o cilindro giratório, com comportamento semelhante ao controle (figura 9).

Nossos dados revelam também uma redução no tempo médio para início dos movimentos e a elevação da média de *rearing*, que apesar de não serem significativas em relação ao grupo IAC, poderiam ser um possível indicativo da necessidade de ajuste posológico (dose e/ou tempo de tratamento). Considere-se que, diferente do que ocorre no caso da isquemia, no grupo IAC, o fármaco foi introduzido após 55 dias de intoxicação/dano e exercerá seus efeitos em meio ao processo de abstinência, cujas influências deverão ainda ser avaliadas.

Estes resultados podem também estar vinculados à diversidade dos mecanismos pelos quais o etanol interfere na dinâmica do sistema nervoso central, dispondo de mecanismos físico-químicos, neuroquímicos e citotóxicos, não podendo ignorar sua relação peculiar com sistema neuroimune.

O consumo crônico de etanol é marcado por uma série de adaptações na neuroquímica cerebral, destacando-se a liberação de dopamina e serotonina, o *up regulation* de receptores Glutamatérgicos e *down regulation* da via Gabaérgica, redução da atividade de canais de  $Ca^{2+}$ , entre outras. No advento da abstinência um efeito rebote é desencadeado, levando a hiperativação das vias monoaminérgicas, excitotoxicidade e desequilíbrio do balanço citosólico de  $Ca^{2+}$ . Como visto anteriormente, estes processos culminam na indução de processos neuroinflamatórios e estresse oxidativo.

Reforçando esta hipótese, nossos resultados revelaram uma discreta, porém não significativa, redução das concentrações de nitritos e MDA no córtex motor dos ratos submetidos a IAC durante a adolescência e posteriormente tratados com minociclina.

Adicionalmente, no sentido de subsidiar esta discussão com dados relacionados a neuroinflamação e neurodegeneração, uma avaliação imunohistoquímica está sendo conduzida.

### 5.3 A comorbidade modifica a resposta ao tratamento com minociclina.

Como discutido anteriormente a minociclina tem despontado como uma proposta promissora de tratamento em diversas patologias neurodegenerativas, com grande destaque ao

AVEI. Estudos clínicos já têm demonstrado que o tratamento pós AVEI com este fármaco melhora significativamente o desfecho neurológico dos pacientes avaliados 30, 60 e 90 dias após a admissão a terapia (Srivastava *et al.*, 2012; Amiri-Nikpour *et al.*, 2015).

Uma preocupação relevante na aplicação deste agente, no entanto, diz respeito à interferência de comorbidades. Os estudos pré-clínicos e clínicos realizados até o momento dizem respeito exclusivamente a casos de ocorrência isolada do AVEI, não considerando tais fatores interferentes.

Clínica e epidemiologicamente já se tem considerado o potencial de o etilismo influir no desfecho de pacientes com AVEI. O consumo alcoólico na modalidade de *Heavy drink* (consumo pesado) eleva significativamente a morbidade e a mortalidade de pacientes com AVEI (Patra *et al.*, 2010).

Em síntese, no presente trabalho, já vimos que a minociclina é efetiva em prevenir e/ou atenuar os danos produzidos pela isquemia, tanto no nível comportamental como celular e molecular. Cabe aqui salientar que um dos diferenciais deste trabalho em relação a estudos anteriores, diz respeito a essa visão multidisciplinar, onde a combinação desses três tipos de parâmetros nos permite realizar uma análise mais apurada.

Também vimos que, apesar da tendência observada nas médias, o tratamento por apenas 7 dias com minociclina, não produziu melhoras significativas em um modelo de IAC de 55 dias. Entretanto, o efeito desse fármaco na ocorrência combinada destas patologias é desconhecido na literatura, ainda que na clínica seja relativamente comum encontrar esse quadro. O presente trabalho vem então demonstrar que os efeitos da minociclina na comorbidade são significativamente diferentes (tanto no nível comportamental como celular e molecular) e, as vezes, inesperados (como no caso da redução da ativação microglial e astrocitária, acompanhadas de elevação do estresse oxidativo).

Apesar de que a comorbidade agravou significativamente as alterações comportamentais em relação ao efeito de cada insulto isoladamente (figura 14), o tratamento com minociclina por 7 dias mostrou-se eficaz em reduzir e até mesmo abolir estas alterações, como ocorreu no caso da deambulação total (número de quadrantes cruzados) e do número de quedas no rotarod (figura 14). Apesar disso, é necessário atentar que o desfecho do comportamento motor conservou perdas na capacidade de iniciar movimentos e na

exploração vertical (essa última também conservada no grupo com isquemia que recebeu minociclina) (Figura 14a). Ao confrontar estes dados ao contexto da prática clínica, seu impacto é notório, pois alerta para a possibilidade de um desfecho motor mais desfavorável para o paciente e, ao mesmo tempo, para a necessidade de estudos mais aprofundados, com o objetivo de identificar os ajustes necessários aos tratamentos de AVEI na presença de comorbidades.

A melhora das alterações comportamentais com minociclina na comorbidade foi acompanhada de uma preservação neuronal significativa e diminuição da ativação microglial exacerbada (embora de menores magnitudes quando comparadas ao grupo AVEI+Minociclina) (Figura 15). O controle do estresse oxidativo promovido pela minociclina também não foi tão eficaz como nesse último grupo, permitindo concentrações de nitritos semelhantes àsquelas dos animais isquêmicos não tratados (Figura 16). Entretanto, uma recuperação completa do número total de células no córtex e uma ativação astrocitária comparável àquela do controle (Figura 15), nos faz pensar que o tratamento com minociclina pode se tornar uma opção adequada como parte do protocolo clínico na comorbidade. Estudos futuros poderão mostrar se é possível alcançar uma eficácia máxima com esse fármaco neste complexo quadro clínico ou será necessário o uso de adjuvantes.

Concluindo, nossos resultados vêm então demonstrar efetivamente que o consumo crônico de doses elevadas de etanol iniciado na adolescência agrava a perda neuronal induzida pela isquemia cerebral, através de sua interferência sobre a ativação microglial e potencialização do estresse oxidativo, levando a um desfecho neuromotor mais desfavorável. Demonstra também que a minociclina é efetiva no tratamento da isquemia cortical, mas promoveu menores benefícios aos animais submetidos a IAC. E tão importante quanto isto, revela que este padrão de consumo do etanol, crescente no meio da população humana, é capaz de interferir significativamente no desfecho do tratamento do AVEI com a minociclina, apesar de esta conservar parcialmente seu efeito protetor.

## Referências

---

ADAMS, H. P. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. **Stroke**, v. 24, n. 1, p. 35-41, 1993. ISSN 0039-2499 1524-4628.

AGRAWAL, R. G. et al. Minocycline reduces ethanol drinking. **Brain Behav Immun**, v. 25 Suppl 1, p. S165-9, Jun 2011. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21397005> >.

AHERN, K. B.; LUSTIG, H. S.; GREENBERG, D. A. Enhancement of NMDA toxicity and calcium responses by chronic exposure of cultured cortical neurons to ethanol. **Neurosci Lett**, v. 165, n. 1-2, p. 211-4, Jan 3 1994. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015729> >.

ALAVERDASHVILI, M.; WHISHAW, I. Q. Motor cortex stroke impairs individual digit movement in skilled reaching by the rat. **Eur J Neurosci**, v. 28, n. 2, p. 311-22, Jul 2008. ISSN 1460-9568 (Electronic)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18702702> >.

ALFONSO-LOECHES, S.; GUERRI, C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 48, n. 1, p. 19-47, Jan-Feb 2011. ISSN 1549-781X (Electronic)

1040-8363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21657944> >.

ALFONSO-LOECHES, S. et al. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. **J Neurosci**, v. 30, n. 24, p. 8285-95, Jun 16 2010. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554880> >.

AMIRI-NIKPOUR, M. R. et al. An open-label evaluator-blinded clinical study of minocycline neuroprotection in ischemic stroke: gender-dependent effect. **Acta Neurol Scand**, v. 131, n. 1, p. 45-50, Jan 2015. ISSN 1600-0404 (Electronic)

0001-6314 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25155474> >.

ANTON, R. F.; MOAK, D. H.; LATHAM, P. K. The obsessive compulsive drinking scale: A new method of assessing outcome in alcoholism treatment studies. **Arch Gen Psychiatry**, v. 53, n. 3, p. 225-31, Mar 1996. ISSN 0003-990X (Print)

0003-990X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8611059> >.

BECKMAN, J. S. -OONO: rebounding from nitric oxide. **Circ Res**, v. 89, n. 4, p. 295-7, Aug 17 2001. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11509444> >.

BEGHI, E. et al. Stroke and alcohol intake in a hospital population. A case-control study. **Stroke**, v. 26, n. 9, p. 1691-6, Sep 1995. ISSN 0039-2499 (Print)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7660416> >.

BIGGIO, G. et al. Stress, ethanol, and neuroactive steroids. **Pharmacol Ther**, v. 116, n. 1, p. 140-71, Oct 2007. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555824> >.

BLANCO, A. M.; GUERRI, C. Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors. **Front Biosci**, v. 12, p. 2616-30, 2007. ISSN 1093-9946 (Print)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127267> >.

BLANCO, A. M. et al. Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. **J Immunol**, v. 175, n. 10, p. 6893-9, Nov 15 2005. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272348> >.

BLUM, D. et al. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. **Neurobiol Dis**, v. 17, n. 3, p. 359-66, Dec 2004. ISSN 0969-9961 (Print)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15571972> >.

BORGHESE, C. M. et al. Characterization of two mutations, M287L and Q266I, in the alpha1 glycine receptor subunit that modify sensitivity to alcohols. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 340, n. 2, p. 304-16, Feb 2012. ISSN 1521-0103 (Electronic)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037201> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRETT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 2, p. 682-5, Jan 1990. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689048> >.

BRICK, J.; POHORECKY, L. A.; DETURCK, K. Cardiac lipase: effect of ethanol and stress. **Life Sci**, v. 40, n. 19, p. 1897-901, May 11 1987. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3573986> >.

BROOKES, P. S. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Mitochondrion**, v. 3, n. 4, p. 187-204, Mar 2004. ISSN 1567-7249 (Print)

1567-7249 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120354> >.

BROWN, J., 3RD et al. Binge ethanol-induced neurodegeneration in rat organotypic brain slice cultures: effects of PLA2 inhibitor mepacrine and docosahexaenoic acid (DHA). **Neurochem Res**, v. 34, n. 2, p. 260-7, Feb 2009. ISSN 1573-6903 (Electronic)

0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18592376> >.

BROWN, S. A.; TAPERT, S. F. Adolescence and the trajectory of alcohol use: basic to clinical studies. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1021, p. 234-44, Jun 2004. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251893> >.

BUCK, K. J.; ALLAN, A. M.; HARRIS, R. A. Fluidization of brain membranes by A2C does not produce anesthesia and does not augment muscimol-stimulated  $^{36}\text{Cl}^-$  influx. **Eur J Pharmacol**, v. 160, n. 3, p. 359-67, Feb 7 1989. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2714367> >.

CAGETTI, E. et al. Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors. **Mol Pharmacol**, v. 63, n. 1, p. 53-64, Jan 2003. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488536> >.

CAPLAN, L. R. Multiple potential risks for stroke. **JAMA**, v. 283, n. 11, p. 1479-80, Mar 15 2000. ISSN 0098-7484 (Print)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10732939> >.

\_\_\_\_\_. Stroke classification: a personal view. **Stroke**, v. 42, n. 1 Suppl, p. S3-6, Jan 2011. ISSN 1524-4628 (Electronic)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21164119> >.

CARDOSO, M. M. et al. Minocycline treatment and bone marrow mononuclear cell transplantation after endothelin-1 induced striatal ischemia. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 197-205, Feb 2013. ISSN 1573-2576 (Electronic)

0360-3997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22945281> >.

CARLINI, E. A. et al. **I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 107 Maiores Cidades do País.** PSICOTRÓPICAS, C. B. D. I. S. D.: 18 p. 2002.

CARVALHO, V. et al. Drug and alcohol use and family characteristics: a study among Brazilian high-school students. **Addiction**, v. 90, n. 1, p. 65-72, Jan 1995. ISSN 0965-2140 (Print)

0965-2140 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7888981> >.

CHAN, P. H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, n. 1, p. 2-14, Jan 2001. ISSN 0271-678X (Print)

0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11149664> >.

CHANDLER, L. J. et al. Chronic ethanol exposure potentiates NMDA excitotoxicity in cerebral cortical neurons. **J Neurochem**, v. 60, n. 4, p. 1578-81, Apr 1993. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8455043> >.

CHEN, H. et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 8, p. 1505-17, Apr 15 2011. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20812869> >.

CHEN, X. et al. Minocycline reduces oxygen-glucose deprivation-induced PC12 cell cytotoxicity via matrix metalloproteinase-9, integrin beta1 and phosphorylated Akt modulation. **Neurol Sci**, v. 34, n. 8, p. 1391-6, Aug 2013. ISSN 1590-3478 (Electronic)

1590-1874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224583> >.

CHIU, D. et al. Intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: feasibility, safety, and efficacy in the first year of clinical practice. **Stroke**, v. 29, n. 1, p. 18-22, Jan 1998. ISSN 0039-2499 (Print)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445322> >.

CLARKSON, A. N. et al. Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 33, n. 5, p. 716-23, May 2013. ISSN 1559-7016 (Electronic)

0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23385201> >.

COJOCARU, I. M. et al. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. **Rom J Intern Med**, v. 51, n. 2, p. 97-106, Apr-Jun 2013. ISSN 1220-4749 (Print)

1220-4749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24294813> >.

COLLINS, M. A.; NEAFSEY, E. J. Ethanol and adult CNS neurodamage: oxidative stress, but possibly not excitotoxicity. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 4, p. 1358-67, 2012. ISSN 1945-0508 (Electronic)

1945-0494 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201960> >.

COPIN, J. C. et al. Role of matrix metalloproteinases in apoptosis after transient focal cerebral ischemia in rats and mice. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 7, p. 1597-608, Oct 2005. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16197500> >.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, n. 5134, p. 689-95, Oct 29 1993. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7901908> >.

CREWS, F. T.; NIXON, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. **Alcohol Alcohol**, v. 44, n. 2, p. 115-27, Mar-Apr 2009. ISSN 1464-3502 (Electronic)

0735-0414 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18940959> >.

DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. **Brain Pathol**, v. 4, n. 1, p. 49-57, Jan 1994. ISSN 1015-6305 (Print)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7517769> >.

DAVIES, M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. **J Psychiatry Neurosci**, v. 28, n. 4, p. 263-74, Jul 2003. ISSN 1180-4882 (Print)

1180-4882 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12921221> >.

DAVIS, R. L.; SYAPIN, P. J. Acute ethanol exposure modulates expression of inducible nitric-oxide synthase in human astroglia: evidence for a transcriptional mechanism. **Alcohol**, v. 32, n. 3, p. 195-202, Apr 2004. ISSN 0741-8329 (Print)

0741-8329 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15282113> >.

DE LA MONTE, S. M.; KRIL, J. J. Human alcohol-related neuropathology. **Acta Neuropathol**, v. 127, n. 1, p. 71-90, Jan 2014. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24370929> >.

DENICOLA, A.; RADII, R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. **Toxicology**, v. 208, n. 2, p. 273-88, Mar 15 2005. ISSN 0300-483X (Print)

0300-483X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15691591> >.

DING, S. Dynamic reactive astrocytes after focal ischemia. **Neural Regen Res**, v. 9, n. 23, p. 2048-52, Dec 1 2014. ISSN 1673-5374 (Print)

1673-5374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25657720> >.

DODD, P. R. et al. Glutamate-mediated transmission, alcohol, and alcoholism. **Neurochem Int**, v. 37, n. 5-6, p. 509-33, Nov-Dec 2000. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871702> >.

DOREMUS-FITZWATER, T. L.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Motivational systems in adolescence: possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. **Brain Cogn**, v. 72, n. 1, p. 114-23, Feb 2010. ISSN 1090-2147 (Electronic)

0278-2626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762139> >.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-8, Sep 2008. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308346> >.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)**, v. 46, n. 3, p. 208-9, Mar 1957. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13502156> >.

EGGERS, E. D.; BERGER, A. J. Mechanisms for the modulation of native glycine receptor channels by ethanol. **J Neurophysiol**, v. 91, n. 6, p. 2685-95, Jun 2004. ISSN 0022-3077 (Print)

0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762156> >.

EKDAHL, C. T. et al. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 23, p. 13632-7, Nov 11 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581618> >.

ELLIOTT, E. J.; BOWER, C. Alcohol and pregnancy: the pivotal role of the obstetrician. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 48, n. 3, p. 236-9, Jun 2008. ISSN 1479-828X (Electronic)

0004-8666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18532952> >.

ENDRES, M.; DIRNAGL, U.; MOSKOWITZ, M. A. Chapter 2 The ischemic cascade and mediators of ischemic injury. v. 92, p. 31-41, 2008. ISSN 00729752.

ENDRES, M. et al. Targeting eNOS for stroke protection. **Trends Neurosci**, v. 27, n. 5, p. 283-9, May 2004. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111011> >.

ENOCH, M. A. The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 90, n. 1, p. 95-104, Jul 2008. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440057> >.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-21, 1990. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2233308> >.

F.D.A. **Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers Exploratory IND Studies**. SERVICES, U. S. D. O. H. A. H.: Food and Drug Administration 2006.

FAN, L. W. et al. Minocycline attenuates hypoxia-ischemia-induced neurological dysfunction and brain injury in the juvenile rat. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 2, p. 341-50, Jul 2006. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16836639> >.

FEHR, C. et al. Confirmation of association of the GABRA2 gene with alcohol dependence by subtype-specific analysis. **Psychiatr Genet**, v. 16, n. 1, p. 9-17, Feb 2006. ISSN 0955-8829 (Print)

0955-8829 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16395124> >.

FERNANDEZ-LIZARBE, S. et al. Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. **Mol Immunol**, v. 45, n. 7, p. 2007-16, Apr 2008. ISSN 0161-5890 (Print)

0161-5890 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18061674> >.

FERNANDEZ-LIZARBE, S.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. **J Immunol**, v. 183, n. 7, p. 4733-44, Oct 1 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19752239> >.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 43, n. 1, p. 61-8, Jan-Mar 1997. ISSN 0104-4230 (Print)

0104-4230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224995> >.

FERREIRA, M. P.; WILLOUGHBY, D. Alcohol consumption: the good, the bad, and the indifferent. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 33, n. 1, p. 12-20, Feb 2008. ISSN 1715-5312 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347649> >.

FISKUM, G.; MURPHY, A. N.; BEAL, M. F. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, n. 4, p. 351-69, Apr 1999. ISSN 0271-678X (Print) 0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10197505> >.

FORTES, Z. B.; DE NUCCI, G.; GARCIA-LEME, J. Effect of endothelin-1 on arterioles and venules in vivo. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 13 Suppl 5, p. S200-1, 1989. ISSN 0160-2446 (Print) 0160-2446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2473310> >.

FRANCO, E. C. et al. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. **Neurosci Res**, v. 73, n. 2, p. 122-32, Jun 2012. ISSN 1872-8111 (Electronic) 0168-0102 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22465414> >.

FROST, L. et al. Trends in risk of stroke in patients with a hospital diagnosis of nonvalvular atrial fibrillation: National Cohort Study in Denmark, 1980-2002. **Neuroepidemiology**, v. 26, n. 4, p. 212-9, 2006. ISSN 0251-5350 (Print) 0251-5350 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16645320> >.

FUJIMURA, M. et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. **Brain Res**, v. 842, n. 1, p. 92-100, Sep 18 1999. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10526099> >.

FUJIMURA, M. et al. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 18, n. 11, p. 1239-47, Nov 1998. ISSN 0271-678X (Print) 0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809513> >.

GALDUROZ, J. C.; CAETANO, R. [Epidemiology of alcohol use in Brazil]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26 Suppl 1, p. S3-6, May 2004. ISSN 1516-4446 (Print) 1516-4446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15729435> >.

GIEDD, J. Brain development, IX: human brain growth. **Am J Psychiatry**, v. 156, n. 1, p. 4, Jan 1999. ISSN 0002-953X (Print) 0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892290> >.

GILL, J. S. et al. Stroke and alcohol consumption. **N Engl J Med**, v. 315, n. 17, p. 1041-6, Oct 23 1986. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2876380> >.



GILMAN, S. Pharmacologic management of ischemic stroke: relevance to stem cell therapy. **Exp Neurol**, v. 199, n. 1, p. 28-36, May 2006. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631744> >.

GINSBERG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 363-89, Sep 2008. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308347> >.

GO, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 129, n. 3, p. e28-e292, Jan 21 2014. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24352519> >.

GO, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 127, n. 1, p. e6-e245, Jan 1 2013. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239837> >.

GONZÁLEZ, R. G. Imaging-guided acute ischemic stroke therapy: From "time is brain" to "physiology is brain". **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 27, n. 4, p. 728-735, 2006. ISSN 1936-959X.

GOOD, M. L.; HUSSEY, D. L. Minocycline: stain devil? **Br J Dermatol**, v. 149, n. 2, p. 237-9, Aug 2003. ISSN 0007-0963 (Print)

0007-0963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12932226> >.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 12, p. 7764-8, Dec 1981. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6950416> >.

GROBIN, A. C. et al. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 139, n. 1-2, p. 2-19, Sep 1998. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9768538> >.

GUPTA, Y. K.; CHAUHAN, A. Potential of immunosuppressive agents in cerebral ischaemia. **Indian J Med Res**, v. 133, p. 15-26, Jan 2011. ISSN 0971-5916 (Print)

0971-5916 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321416> >.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem**, v. 59, n. 5, p. 1609-23, Nov 1992. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1402908> >.

\_\_\_\_\_. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-4, Sep 10 1994. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915779> >.

HAORAH, J. et al. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 11, p. 1542-50, Dec 1 2008. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845238> >.

HARDINGHAM, G. E. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 6, p. 1147-60, Dec 2009. ISSN 1470-8752 (Electronic)

0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909238> >.

HARRIS, R. A. Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? **Alcohol Clin Exp Res**, v. 23, n. 10, p. 1563-70, Oct 1999. ISSN 0145-6008 (Print)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10549986> >.

HAYAKAWA, K. et al. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. **Stroke**, v. 39, n. 3, p. 951-8, Mar 2008. ISSN 1524-4628 (Electronic)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258837> >.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med**, v. 107, n. 5, p. 401-4, May 1986. ISSN 0022-2143 (Print)

0022-2143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3701187> >.

HEILIG, M. et al. Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 11, p. 670-84, Nov 2011. ISSN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011682> >.

HIRONO, M.; YAMADA, M.; OBATA, K. Ethanol enhances both action potential-dependent and action potential-independent GABAergic transmission onto cerebellar Purkinje cells. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 2, p. 109-20, Aug 2009. ISSN 1873-7064 (Electronic)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426745> >.

HOBART, J. C. et al. Quality of life measurement after stroke: uses and abuses of the SF-36. **Stroke**, v. 33, n. 5, p. 1348-56, May 2002. ISSN 1524-4628 (Electronic)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988614> >.

HSIEH, R. J.; KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Adv Food Nutr Res**, v. 33, p. 233-341, 1989. ISSN 1043-4526 (Print)

1043-4526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2697233> >.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am J Clin Pathol**, v. 75, n. 5, p. 734-8, May 1981. ISSN 0002-9173 (Print)

0002-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6165237> >.

HU, C. A. et al. Overexpression of proline oxidase induces proline-dependent and mitochondria-mediated apoptosis. **Mol Cell Biochem**, v. 295, n. 1-2, p. 85-92, Jan 2007. ISSN 0300-8177 (Print)

0300-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16874462> >.

HUBRECHT, R.; KIRKWOOD, J. **The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals**. UFAW, 2010. ISBN 9781405175234.

HULIN, M. W.; AMATO, R. J.; WINSAUER, P. J. GABA(A) receptor modulation during adolescence alters adult ethanol intake and preference in rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 36, n. 2, p. 223-33, Feb 2012. ISSN 1530-0277 (Electronic)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21895721> >.

I.N.P.A.D. **II levantamento nacional de álcool e drogas**. 2013

IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 3, p. 132-9, Mar 1997. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9061868> >.

IADECOLA, C. et al. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. **J Neurosci**, v. 17, n. 23, p. 9157-64, Dec 1 1997. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364062> >.

ISO, H. et al. Alcohol consumption and risk of stroke among middle-aged men: the JPHC Study Cohort I. **Stroke**, v. 35, n. 5, p. 1124-9, May 2004. ISSN 1524-4628 (Electronic)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15017008> >.

JERNIGAN, T. L. et al. Maturation of human cerebrum observed in vivo during adolescence. **Brain**, v. 114 ( Pt 5), p. 2037-49, Oct 1991. ISSN 0006-8950 (Print)

0006-8950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1933232> >.

JOHNSON, D. A. et al. Ethanol-induced fluidization of brain lipid bilayers: required presence of cholesterol in membranes for the expression of tolerance. **Mol Pharmacol**, v. 15, n. 3, p. 739-46, May 1979. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/492153> >.

JUNG, S.; AKABAS, M. H.; HARRIS, R. A. Functional and structural analysis of the GABAA receptor alpha 1 subunit during channel gating and alcohol modulation. **J Biol Chem**, v. 280, n. 1, p. 308-16, Jan 7 2005. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15522868> >.

KAUR, J. et al. The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 24, n. 9, p. 945-63, Sep 2004. ISSN 0271-678X (Print)

0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356416> >.

KHALSA, J. H. et al. Medical consequences of drug abuse and co-occurring infections: research at the National Institute on Drug Abuse. **Subst Abus**, v. 29, n. 3, p. 5-16, 2008. ISSN 0889-7077 (Print)

0889-7077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19042203> >.

KIGERL, K. A. et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. **J Neurosci**, v. 29, n. 43, p. 13435-44, Oct 28 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864556> >.

KIM, H. S.; SUH, Y. H. Minocycline and neurodegenerative diseases. **Behav Brain Res**, v. 196, n. 2, p. 168-79, Jan 23 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18977395> >.

KLEIM, J. A.; BOYCHUK, J. A.; ADKINS, D. L. Rat models of upper extremity impairment in stroke. **ILAR J**, v. 48, n. 4, p. 374-84, 2007. ISSN 1084-2020 (Print)

1084-2020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17712223> >.

KNAPP, D. J. et al. Regional specificity of ethanol and NMDA action in brain revealed with FOS-like immunohistochemistry and differential routes of drug administration. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 11, p. 1662-72, Nov 2001. ISSN 0145-6008 (Print)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707641> >.

KNOPIK, V. S. et al. Paternal alcoholism and offspring ADHD problems: a children of twins design. **Twin Res Hum Genet**, v. 12, n. 1, p. 53-62, Feb 2009. ISSN 1832-4274 (Print)

1832-4274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210180> >.

KOBAYASHI, K. et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e525, 2013. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470532> >.

KONDO, T. et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. **J Neurosci**, v. 17, n. 11, p. 4180-9, Jun 1 1997. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151735> >.

KRAUS, R. L. et al. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. **J Neurochem**, v. 94, n. 3, p. 819-27, Aug 2005. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033424> >.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat Med**, v. 6, n. 5, p. 513-9, May 2000. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802706> >.

KRYSTAL, J. H. et al. Characterization of the interactive effects of glycine and D-cycloserine in men: further evidence for enhanced NMDA receptor function associated with human alcohol dependence. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 701-10, Feb 2011. ISSN 1740-634X (Electronic)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124304> >.

KUMAR, S.; FLEMING, R. L.; MORROW, A. L. Ethanol regulation of gamma-aminobutyric acid A receptors: genomic and nongenomic mechanisms. **Pharmacol Ther**, v. 101, n. 3, p. 211-26, Mar 2004. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031000> >.

KUMAR, S. et al. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 205, n. 4, p. 529-64, Sep 2009. ISSN 1432-2072 (Electronic)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19455309> >.

LACZA, Z. et al. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 10, p. 1217-28, Nov 15 2003. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607521> >.

LAI, A. Y.; TODD, K. G. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 84, n. 1, p. 49-59, Jan 2006. ISSN 0008-4212 (Print)

0008-4212 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845890> >.

LAI, T. W.; ZHANG, S.; WANG, Y. T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. **Prog Neurobiol**, v. 115, p. 157-88, Apr 2014. ISSN 1873-5118 (Electronic)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361499> >.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **J Transl Med**, v. 7, p. 97, 2009. ISSN 1479-5876 (Electronic)

1479-5876 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919699> >.

LAMPL, Y. et al. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. **Neurology**, v. 69, n. 14, p. 1404-10, Oct 2 2007. ISSN 1526-632X (Electronic)

0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909152> >.

LARANJEIRA, R. et al. **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) – 2012**. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014

LEE, S. R. et al. Extracellular proteolytic pathophysiology in the neurovascular unit after stroke. **Neurol Res**, v. 26, n. 8, p. 854-61, Dec 2004. ISSN 0161-6412 (Print)

0161-6412 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15727269> >.

LI, C.; YUAN, K.; SCHLUESENER, H. Impact of minocycline on neurodegenerative diseases in rodents: a meta-analysis. **Rev Neurosci**, v. 24, n. 5, p. 553-62, 2013. ISSN 0334-1763 (Print)

0334-1763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24077620> >.

LI, H. et al. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice. **BMC Neurosci**, v. 15, p. 58, 2014. ISSN 1471-2202 (Electronic)

1471-2202 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24886391> >.

LI, J. et al. Chronic ethanol intake-induced changes in open-field behavior and calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV expression in nucleus accumbens of rats: naloxone reversal. **Acta Pharmacol Sin**, v. 29, n. 6, p. 646-52, Jun 2008. ISSN 1745-7254 (Electronic)

1671-4083 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501110> >.

LI, J.; MCCULLOUGH, L. D. Sex differences in minocycline-induced neuroprotection after experimental stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 29, n. 4, p. 670-4, Apr 2009. ISSN 1559-7016 (Electronic)

0271-678X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190654> >.

LIAO, B. et al. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. **Exp Neurol**, v. 237, n. 1, p. 147-52, Sep 2012. ISSN 1090-2430 (Electronic)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735487> >.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1431-568, Oct 1999. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508238> >.

LITTLE, P. J. et al. Differential effects of ethanol in adolescent and adult rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, n. 8, p. 1346-51, Nov 1996. ISSN 0145-6008 (Print)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8947309> >.

LIU, B. et al. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. **J Neurosci**, v. 26, n. 20, p. 5309-19, May 17 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707783> >.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Med J**, v. 123, n. 1, p. 3-4, Jan 2 2005. ISSN 1516-3180 (Print)

1516-3180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821807> >.

LOTUFO, P. A.; BENSENOR, I. M. Trends of stroke subtypes mortality in Sao Paulo, Brazil (1996-2003). **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, n. 4, p. 951-5, Dec 2005. ISSN 0004-282X (Print)

0004-282X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16400411> >.

LOUREIRO, S. O. et al. Dual action of chronic ethanol treatment on LPS-induced response in C6 glioma cells. **J Neuroimmunol**, v. 249, n. 1-2, p. 8-15, Aug 15 2012. ISSN 1872-8421 (Electronic)

0165-5728 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22560157> >.

LOVINGER, D. M. 5-HT<sub>3</sub> receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic. **Neurochem Int**, v. 35, n. 2, p. 125-30, Aug 1999. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405996> >.

LUNDSTROM, E.; TERENT, A.; BORG, J. Prevalence of disabling spasticity 1 year after first-ever stroke. **Eur J Neurol**, v. 15, n. 6, p. 533-9, Jun 2008. ISSN 1468-1331 (Electronic)

1351-5101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18355307> >.

MAIER, S. E.; WEST, J. R. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. **Alcohol Res Health**, v. 25, n. 3, p. 168-74, 2001. ISSN 1535-7414 (Print)

1535-7414 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11810954> >.

MARKWIESE, B. J. et al. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, n. 2, p. 416-21, Apr 1998. ISSN 0145-6008 (Print)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9581648> >.

MARSHALL, S. A. et al. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. **Neurobiol Dis**, v. 54, p. 239-51, Jun 2013. ISSN 1095-953X (Electronic)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313316> >.

MATSUKAWA, N. et al. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. **BMC Neurosci**, v. 10, p. 126, 2009. ISSN 1471-2202 (Electronic)

1471-2202 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19807907> >.

MCCLAIN, J. A. et al. Adolescent binge alcohol exposure induces long-lasting partial activation of microglia. **Brain Behav Immun**, v. 25 Suppl 1, p. S120-8, Jun 2011. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21262339> >.

MEDINA, K. L. et al. Prefrontal cortex volumes in adolescents with alcohol use disorders: unique gender effects. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, n. 3, p. 386-94, Mar 2008. ISSN 1530-0277 (Electronic)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18302722> >.

MENDENHALL, C. L.; MACGEE, J.; GREEN, E. S. Simple rapid and sensitive method for the simultaneous quantitation of ethanol and acetaldehyde in biological materials using head-space gas chromatography. **J Chromatogr**, v. 190, n. 1, p. 197-200, Mar 21 1980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7380945> >.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 151-67, Dec 2004. ISSN 0885-7490 (Print)

0885-7490 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554412> >.

MESTRINER, R. G. et al. Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. **Behav Brain Res**, v. 244, p. 82-9, May 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23403282> >.

MICHAEL, K. M.; SHAUGHNESSY, M. Stroke prevention and management in older adults. **J Cardiovasc Nurs**, v. 21, n. 5 Suppl 1, p. S21-6, Sep-Oct 2006. ISSN 1550-5049 (Electronic)

0889-4655 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966926> >.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. Basal-ganglia 'projections' to the prefrontal cortex of the primate. **Cereb Cortex**, v. 12, n. 9, p. 926-35, Sep 2002. ISSN 1047-3211 (Print)

1047-3211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183392> >.

MIGUEL-HIDALGO, J. J. Withdrawal from free-choice ethanol consumption results in increased packing density of glutamine synthetase-immunoreactive astrocytes in the prelimbic cortex of alcohol-preferring rats. **Alcohol Alcohol**, v. 41, n. 4, p. 379-85, Jul-Aug 2006. ISSN 0735-0414 (Print)

0735-0414 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484281> >.

MOYANOVA, S. G. et al. Multimodal assessment of neuroprotection applied to the use of MK-801 in the endothelin-1 model of transient focal brain ischemia. **Brain Res**, v. 1153, p. 58-67, Jun 11 2007. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17466282> >.

MS, M. D. S. **Informações de saúde - Informações epidemiológicas e morbidade. DATASUS 2013.**

MUGGIRONI, G.; FOIS, G. R.; DIANA, M. Ethanol-derived acetaldehyde: pleasure and pain of alcohol mechanism of action. **Front Behav Neurosci**, v. 7, p. 87, 2013. ISSN 1662-5153 (Electronic)

1662-5153 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23882197> >.

MURPHY, M. P. et al. A simple and rapid test of sensorimotor function in the aged rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 64, n. 2, p. 181-6, Sep 1995. ISSN 1074-7427 (Print)

1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7582826> >.

N.I.A.A.A. Overview of Alcohol Consumption - Drinking Levels Defined 2015. Disponível em: < <http://www.niaaa.nih.gov/alcoholhealth/overviewalcoholconsumption/moderatebingedinking> >. Acesso em: 28 de janeiro 2015.

N.I.N.D.S. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. **N Engl J Med**, v. 333, n. 24, p. 1581-7, Dec 14 1995. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477192> >.

NAGY, L. E. et al. Ethanol and membrane protein trafficking: diverse mechanisms of ethanol action. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, n. 2, p. 287-93, Feb 2002. ISSN 0145-6008 (Print)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11964570> >.

NARAHASHI, T. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 294, n. 1, p. 1-26, Jul 2000. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871290> >.

NARAHASHI, T. et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new target site of ethanol. **Neurochem Int**, v. 35, n. 2, p. 131-41, Aug 1999. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405997> >.

NARAHASHI, T. et al. Neuroreceptors and ion channels as targets of alcohol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 5 Suppl ISBRA, p. 182S-188S, May 2001. ISSN 0145-6008 (Print)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11391069> >.

NELSON, M. L.; LEVY, S. B. The history of the tetracyclines. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1241, p. 17-32, Dec 2011. ISSN 1749-6632 (Electronic)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22191524> >.

NGUEMENI, C. et al. Time course of neuronal death following endothelin-1 induced focal ischemia in rats. **J Neurosci Methods**, v. 242C, p. 72-76, Jan 10 2015. ISSN 1872-678X (Electronic)

0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25583382> >.

NICOLE, O. et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. **Nat Med**, v. 7, n. 1, p. 59-64, Jan 2001. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11135617> >.

NOBLE, W.; GARWOOD, C. J.; HANGER, D. P. Minocycline as a potential therapeutic agent in neurodegenerative disorders characterised by protein misfolding. **Prion**, v. 3, n. 2, p. 78-83, Apr-Jun 2009. ISSN 1933-690X (Electronic)

1933-6896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19458490> >.

O'DONNELL, M. J. et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. **Lancet**, v. 376, n. 9735, p. 112-23, Jul 10 2010. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20561675> >.

OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the rat. In: NEIL, J. D. (Ed.). **The Physiology of Reproduction**. 3rd. San Diego: Academic Press/Elsevier, 2006. p.2061-2126.

OLIVEIRA-FILHO, J. et al. Guidelines for acute ischemic stroke treatment: part I. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 8, p. 621-9, Aug 2012. ISSN 1678-4227 (Electronic)

0004-282X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22899035> >.

OLIVEIRA, G. B. et al. Minocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia in rats chronically exposed to ethanol during adolescence. **Brain Res**, v. 1561, p. 23-34, May 2 2014. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637259> >.

OLNEY, J. W. Glutaate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 28, n. 3, p. 455-74, Jul 1969. ISSN 0022-3069 (Print)

0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5788942> >.

OTERO PALLEIRO, M. M.; BARBAGELATA LOPEZ, C. [Etiologic subtypes of ischemic stroke in young adults aged 18 to 45 years: a study of a series of 93 patients]. **Rev Clin Esp**, v. 207, n. 4, p. 158-65, Apr 2007. ISSN 0014-2565 (Print)

0014-2565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475177> >.

OU, X. M. et al. A novel role for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and monoamine oxidase B cascade in ethanol-induced cellular damage. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 9, p. 855-63, May 1 2010. ISSN 1873-2402 (Electronic)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20022592> >.

PANDEY, S. C. Neuronal signaling systems and ethanol dependence. **Mol Neurobiol**, v. 17, n. 1-3, p. 1-15, Winter 1998. ISSN 0893-7648 (Print)

0893-7648 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887443> >.

PANDOLFO, P. et al. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Eur J Pharmacol**, v. 563, n. 1-3, p. 141-8, Jun 1 2007. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374533> >.

PASCUAL, M. et al. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. **Eur J Neurosci**, v. 25, n. 2, p. 541-50, Jan 2007. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284196> >.

PASCUAL, M. et al. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. **J Neurochem**, v. 108, n. 4, p. 920-31, Feb 2009. ISSN 1471-4159 (Electronic)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19077056> >.

PATRA, J. et al. Alcohol consumption and the risk of morbidity and mortality for different stroke types--a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, v. 10, p. 258, 2010. ISSN 1471-2458 (Electronic)

1471-2458 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20482788> >.

PAXINOS, G. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Elsevier, 2013. ISBN 9780124157521.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E. The distinct role of mGlu1 receptors in post-ischemic neuronal death. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 9, p. 461-70, Sep 2003. ISSN 0165-6147 (Print)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967771> >.

PENG, P. L. et al. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. **Neuron**, v. 49, n. 5, p. 719-33, Mar 2 2006. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504947> >.

PERKINS, D. I. et al. Molecular targets and mechanisms for ethanol action in glycine receptors. **Pharmacol Ther**, v. 127, n. 1, p. 53-65, Jul 2010. ISSN 1879-016X (Electronic)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399807> >.

PINEDO-OTAOLA, S.; DE LA VILLA, F. M. [Value of the MSH classification in the hemiplegic stroke patient]. **Rev Neurol**, v. 31, n. 12, p. 1151-4, Dec 16-31 2000. ISSN 0210-0010 (Print)

0210-0010 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205548> >.

PLANE, J. M. et al. Prospects for minocycline neuroprotection. **Arch Neurol**, v. 67, n. 12, p. 1442-8, Dec 2010. ISSN 1538-3687 (Electronic)

0003-9942 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697034> >.

POMBO, S. et al. Multidimensional alcoholism typologies: could they guide clinical practice? Results from a 3-month prospective study. **Int J Psychiatry Clin Pract**, p. 1-35, Feb 9 2015. ISSN 1471-1788 (Electronic)

1365-1501 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25666860> >.

PROCTOR, W. R. et al. Ethanol differentially enhances hippocampal GABA A receptor-mediated responses in protein kinase C gamma (PKC gamma) and PKC epsilon null mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 305, n. 1, p. 264-70, Apr 2003. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649378> >.

QIN, L.; CREWS, F. T. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 130, 2012a. ISSN 1742-2094 (Electronic)

1742-2094 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22709825> >.

\_\_\_\_\_. NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 5, 2012b. ISSN 1742-2094 (Electronic)

1742-2094 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240163> >.

RADI, R. et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys**, v. 288, n. 2, p. 481-7, Aug 1 1991. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654835> >.

REHM, J. et al. Alcohol as a risk factor for global burden of disease. **Eur Addict Res**, v. 9, n. 4, p. 157-64, Oct 2003. ISSN 1022-6877 (Print)

1022-6877 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970584> >.

RIGGS, J. E. Tissue-Type Plasminogen Activator Should Not Be Used in Acute Ischemic Stroke. **Archives of Neurology**, v. 53, n. 12, p. 1306-1308, 1996. ISSN 0003-9942.

RIIKONEN, J. et al. Intermittent ethanol exposure increases the number of cerebellar microglia. **Alcohol Alcohol**, v. 37, n. 5, p. 421-6, Sep-Oct 2002. ISSN 0735-0414 (Print)



0735-0414 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12217931> >.

ROBERTO, M. et al. Chronic ethanol exposure and protracted abstinence alter NMDA receptors in central amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 5, p. 988-96, May 2006. ISSN 0893-133X (Print)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16052244> >.

RON, D.; WANG, J. The NMDA Receptor and Alcohol Addiction. In: VAN DONGEN, A. M. (Ed.). **Biology of the NMDA Receptor**. Boca Raton (FL), 2009. (Frontiers in Neuroscience). ISBN 9781420044140.

ROOME, R. B. et al. A reproducible Endothelin-1 model of forelimb motor cortex stroke in the mouse. **J Neurosci Methods**, v. 233, p. 34-44, Aug 15 2014. ISSN 1872-678X (Electronic)

0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24915635> >.

ROSAMOND, W. et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 115, n. 5, p. e69-171, Feb 6 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194875> >.

RUBANYI, G. M.; POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 3, p. 325-415, Sep 1994. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7831383> >.

S.B.D.C. Primeiro consenso brasileiro do tratamento da fase aguda do acidente vascular cerebral. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 59, n. 4, p. 972-980, 2001. ISSN 0004-282X.

S.E.N.A.D. **Drogas: Cartilha álcool e jovens**. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. Brasília-DF. 2011

S.M.A. **Results from the 2012 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings, NSDUH 2013**

SANCHIS, C.; ARAGÓN, C. M. G. ¿Qué bebemos cuando bebemos? El papel del acetaldehído en el consumo de alcohol. **Adicciones**, v. 19, n. 1, p. 5-11, 2007. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/pdf/2891/289122034003.pdf> >.

SAPADIN, A. N.; FLEISCHMAJER, R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. **J Am Acad Dermatol**, v. 54, n. 2, p. 258-65, Feb 2006. ISSN 1097-6787 (Electronic)

0190-9622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443056> >.

SCARABELLI, T. M. et al. Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. **J Am Coll Cardiol**, v. 43, n. 5, p. 865-74, Mar 3 2004. ISSN 0735-1097 (Print)

0735-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998631> >.

SCHILDKNECHT, S. et al. Neuroprotection by minocycline caused by direct and specific scavenging of peroxynitrite. **J Biol Chem**, v. 286, n. 7, p. 4991-5002, Feb 18 2011. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21081502> >.

SCHUCKIT, M. A. Alcohol-use disorders. **Lancet**, v. 373, n. 9662, p. 492-501, Feb 7 2009. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168210> >.

SELEMON, L. D. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e238, 2013. ISSN 2158-3188 (Electronic)

2158-3188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462989> >.

SELF, R. L. et al. Ethanol exposure and withdrawal sensitizes the rat hippocampal CA1 pyramidal cell region to beta-amyloid (25-35)-induced cytotoxicity: NMDA receptor involvement. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 29, n. 11, p. 2063-9, Nov 2005. ISSN 0145-6008 (Print)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340465> >.

SHARMA, D. R. et al. Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 240, n. 2, p. 208-18, Oct 15 2009. ISSN 1096-0333 (Electronic)

0041-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19560481> >.

SILVERI, M. M.; SPEAR, L. P. Decreased sensitivity to the hypnotic effects of ethanol early in ontogeny. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, n. 3, p. 670-6, May 1998. ISSN 0145-6008 (Print)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622449> >.

SISK, C. L.; FOSTER, D. L. The neural basis of puberty and adolescence. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 10, p. 1040-7, Oct 2004. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452575> >.

SNAPHAAN, L.; DE LEEUW, F. E. Poststroke memory function in nondemented patients: a systematic review on frequency and neuroimaging correlates. **Stroke**, v. 38, n. 1, p. 198-203, Jan 2007. ISSN 1524-4628 (Electronic)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158333> >.

SPANAGEL, R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. **Physiol Rev**, v. 89, n. 2, p. 649-705, Apr 2009. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342616> >.

SPEAR, L. P. Adolescent alcohol exposure: Are there separable vulnerable periods within adolescence? **Physiol Behav**, Jan 23 2015. ISSN 1873-507X (Electronic)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25624108> >.

SRIVASTAVA, K.; BATH, P. M.; BAYRAKTUTAN, U. Current therapeutic strategies to mitigate the eNOS dysfunction in ischaemic stroke. **Cell Mol Neurobiol**, v. 32, n. 3, p. 319-36, Apr 2012. ISSN 1573-6830 (Electronic)

0272-4340 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198555> >.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001. ISSN 1081-0706 (Print)

1081-0706 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687497> >.

SUGAWARA, T.; CHAN, P. H. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, n. 5, p. 597-607, Oct 2003. ISSN 1523-0864 (Print)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580316> >.

SUZDAK, P. D.; PAUL, S. M. Ethanol stimulates GABA receptor-mediated Cl<sup>-</sup> ion flux in vitro: possible relationship to the anxiolytic and intoxicating actions of alcohol. **Psychopharmacol Bull**, v. 23, n. 3, p. 445-51, 1987. ISSN 0048-5764 (Print)

0048-5764 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2893423> >.

SWARTZWELDER, H. S.; WILSON, W. A.; TAYYEB, M. I. Differential sensitivity of NMDA receptor-mediated synaptic potentials to ethanol in immature versus mature hippocampus. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 19, n. 2, p. 320-3, Apr 1995. ISSN 0145-6008 (Print)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7625564> >.

TEIXEIRA, F. B. et al. Chronic ethanol exposure during adolescence in rats induces motor impairments and cerebral cortex damage associated with oxidative stress. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e101074, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967633> >.

THANAN, R. et al. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 1, p. 193-217, 2014. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25547488> >.

TOBAMIDANIK, L.; ZABKIEWICZ, D. Indicators of sense of coherence and alcohol consumption-related problems: the 2000 U.S. National alcohol survey. **Subst Use Misuse**, v. 44, n. 3, p. 357-73, 2009. ISSN 1532-2491 (Electronic)

1082-6084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19212927> >.

TOUMBOUROU, J. W. et al. Adolescent predictors and environmental correlates of young adult alcohol use problems. **Addiction**, v. 109, n. 3, p. 417-24, Mar 2014. ISSN 1360-0443 (Electronic)

0965-2140 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24321051> >.

UHART, M.; WAND, G. S. Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research. **Addict Biol**, v. 14, n. 1, p. 43-64, Jan 2009. ISSN 1369-1600 (Electronic)

1355-6215 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18855803> >.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905> >.

VALLES, S. L. et al. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. **Brain Pathol**, v. 14, n. 4, p. 365-71, Oct 2004. ISSN 1015-6305 (Print)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15605983> >.

VENGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 2, p. 299-315, May 2008. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311194> >.

VYKLICKY, V. et al. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. **Physiol Res**, v. 63 Suppl 1, p. S191-203, 2014. ISSN 1802-9973 (Electronic)

0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564659> >.

W.H.O. **Self-help strategies for cutting down or stopping substance use: a guide**. World Health Organization, 2010. ISBN 9789241599405 5 Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599405\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599405_eng.pdf) >.

\_\_\_\_\_. **Global status report on alcohol and health – 2014**. World Health Organization, 2014a. ISBN 9789240692763

\_\_\_\_\_. **The top 10 causes of death 2014**. World Health Organization 2014b.

WAHL, F. et al. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 23, n. 2, p. 267-72, Feb 1992. ISSN 0039-2499 (Print)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1561657> >.

WALLNER, M.; HANCHAR, H. J.; OLSEN, R. W. Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 25, p. 15218-23, Dec 9 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625373> >.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, May 1976. ISSN 0033-2909 (Print)

0033-2909 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582919> >.

WANG, J. H.; SUN, G. Y. Ethanol inhibits cytokine-induced iNOS and sPLA2 in immortalized astrocytes: evidence for posttranscriptional site of ethanol action. **J Biomed Sci**, v. 8, n. 1, p. 126-33, Jan-Feb 2001. ISSN 1021-7770 (Print)

1021-7770 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11173986> >.

WANG, X. et al. Significant neuroprotection against ischemic brain injury by inhibition of the MEK1 protein kinase in mice: exploration of potential mechanism associated with apoptosis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 304, n. 1, p. 172-8, Jan 2003. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490588> >.

WANNER, I. B. et al. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 33, n. 31, p. 12870-86, Jul 31 2013. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23904622> >.

WARNER, D. S.; SHENG, H.; BATINIC-HABERLE, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. **J Exp Biol**, v. 207, n. Pt 18, p. 3221-31, Aug 2004. ISSN 0022-0949 (Print)

0022-0949 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15299043> >.

WATKINS, C. L. et al. Prevalence of spasticity post stroke. **Clin Rehabil**, v. 16, n. 5, p. 515-22, Aug 2002. ISSN 0269-2155 (Print)

0269-2155 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194622> >.

WEIR, C. J. et al. Targeting neuroprotection clinical trials to ischemic stroke patients with potential to benefit from therapy. **Stroke**, v. 35, n. 9, p. 2111-6, Sep 2004. ISSN 1524-4628 (Electronic)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15243146> >.

WELMER, A. K. et al. Spasticity and its association with functioning and health-related quality of life 18 months after stroke. **Cerebrovasc Dis**, v. 21, n. 4, p. 247-53, 2006. ISSN 1015-9770 (Print)

1015-9770 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446538> >.

WHITE, A. M.; SWARTZWELDER, H. S. Age-related effects of alcohol on memory and memory-related brain function in adolescents and adults. **Recent Dev Alcohol**, v. 17, p. 161-76, 2005. ISSN 0738-422X (Print)

0738-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15789865> >.

WHITE, A. M. et al. Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 73, n. 3, p. 673-7, Oct 2002. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151043> >.

WILLIAMS, K. et al. Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs in vivo and in vitro. **Neuron**, v. 10, n. 2, p. 267-78, Feb 1993. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8439412> >.

WIRKNER, K. et al. Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. **Neurochem Int**, v. 35, n. 2, p. 153-62, Aug 1999. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405999> >.

WISSEL, J.; OLVER, J.; SUNNERHAGEN, K. S. Navigating the poststroke continuum of care. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 22, n. 1, p. 1-8, Jan 2013. ISSN 1532-8511 (Electronic)

1052-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21733720> >.

WU, Y. et al. Attenuation of microglial and IL-1 signaling protects mice from acute alcohol-induced sedation and/or motor impairment. **Brain Behav Immun**, v. 25 Suppl 1, p. S155-64, Jun 2011. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21276848> >.

YAMAMOTO, M. et al. Effects of a new thyrotropin-releasing hormone analogue administered in rats 1 week after middle cerebral artery occlusion. **Stroke**, v. 20, n. 8, p. 1089-91, Aug 1989. ISSN 0039-2499 (Print)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2756541> >.

YANAGISAWA, M. et al. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. **J Hypertens Suppl**, v. 6, n. 4, p. S188-91, Dec 1988. ISSN 0952-1178 (Print)

0952-1178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2853725> >.

YEVENES, G. E.; ZEILHOFER, H. U. Molecular sites for the positive allosteric modulation of glycine receptors by endocannabinoids. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23886, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901142> >.

YILMAZ, O.; BIRBAUMER, N.; RAMOS-MURGUIALDAY, A. Movement related slow cortical potentials in severely paralyzed chronic stroke patients. **Front Hum Neurosci**, v. 8, p. 1033, 2014. ISSN 1662-5161 (Electronic)

1662-5161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642177> >.

YONG, V. W. et al. The promise of minocycline in neurology. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 12, p. 744-51, Dec 2004. ISSN 1474-4422 (Print)

1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556807> >.

YOO, A. J. et al. The Penumbra Stroke System: a technical review. **J Neurointerv Surg**, v. 4, n. 3, p. 199-205, May 2012. ISSN 1759-8486 (Electronic)

1759-8478 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990525> >.

YOUSUF, S. et al. Neuroprotection Offered by Majun Khadar, A Traditional Unani Medicine, during Cerebral Ischemic Damage in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, Jan 3 2010. ISSN 1741-427X (Print)

1741-427X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047892> >.

YRJANHEIKKI, J. et al. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15769-74, Dec 22 1998. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861045> >.

YRJANHEIKKI, J. et al. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13496-500, Nov 9 1999. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10557349> >.

ZEIGLER, D. W. et al. The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students. **Prev Med**, v. 40, n. 1, p. 23-32, Jan 2005. ISSN 0091-7435 (Print)

0091-7435 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530577> >.

ZHANG, Y. et al. Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. **Anesth Analg**, v. 96, n. 1, p. 97-101, table of contents, Jan 2003. ISSN 0003-2999 (Print)

0003-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505932> >.

ZHAO, B. Q. et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. **Nat Med**, v. 12, n. 4, p. 441-5, Apr 2006. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16565723> >.

ZHAO, Y. N. et al. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. **Behav Brain Res**, v. 236, n. 1, p. 270-82, Jan 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985845> >.

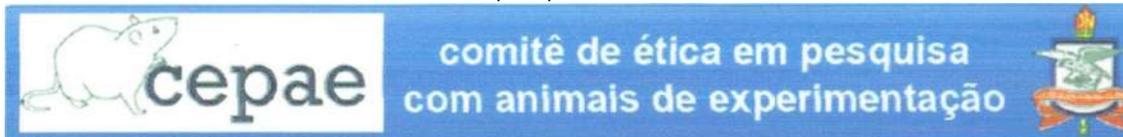
ZHU, W.; BIE, B.; PAN, Z. Z. Involvement of non-NMDA glutamate receptors in central amygdala in synaptic actions of ethanol and ethanol-induced reward behavior. **J Neurosci**, v. 27, n. 2, p. 289-98, Jan 10 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215388> >.

ZIV, I. et al. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 23, n. 7, p. 1014-6, Jul 1992. ISSN 0039-2499 (Print)

0039-2499 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1615534> >.

## Anexo I – Parecer do comitê de ética em pesquisa



### **PARECER BIO007-09**

**Projeto:** Efeitos Neurocomportamentais e Neuroprotetores na recuperação funcional após bloqueio da ativação microglial com minociclina em ratos submetidos à isquemia focal no cortex motor quando tratados cronicamente com etanol da adolescência à fase adulta

**Coordenador:** Prof. Dra Cristiane do Socorro Ferraz Maia

**Área Temática:** Biologia

**Vigência:** 01/2009 a 01/2011

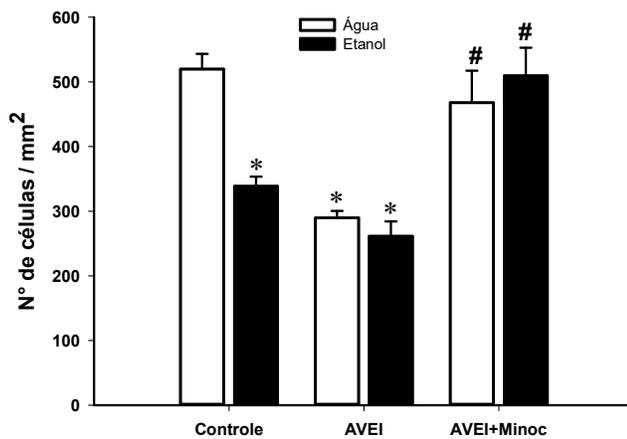
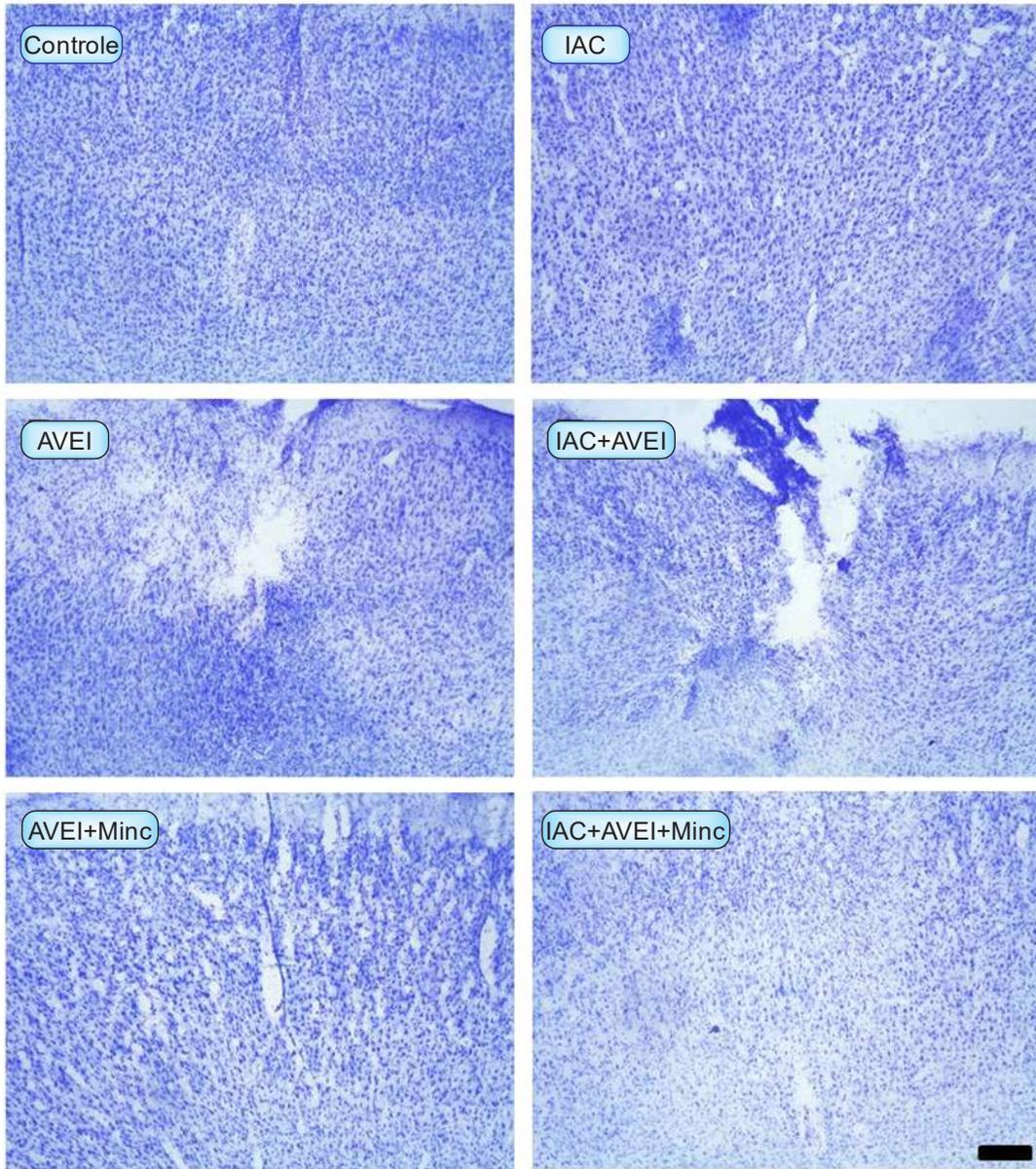
**Nº no CEPAE-UFPA:** BIO001-09

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de janeiro de 2009

  
Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa  
Com Animais de Experimentação da Universidade  
Federal do Pará

Anexo II – Aspectos histológicos do córtex motor corado com violeta de cresila.

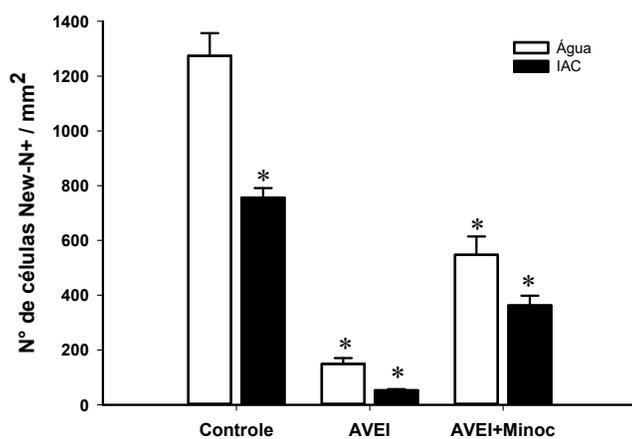
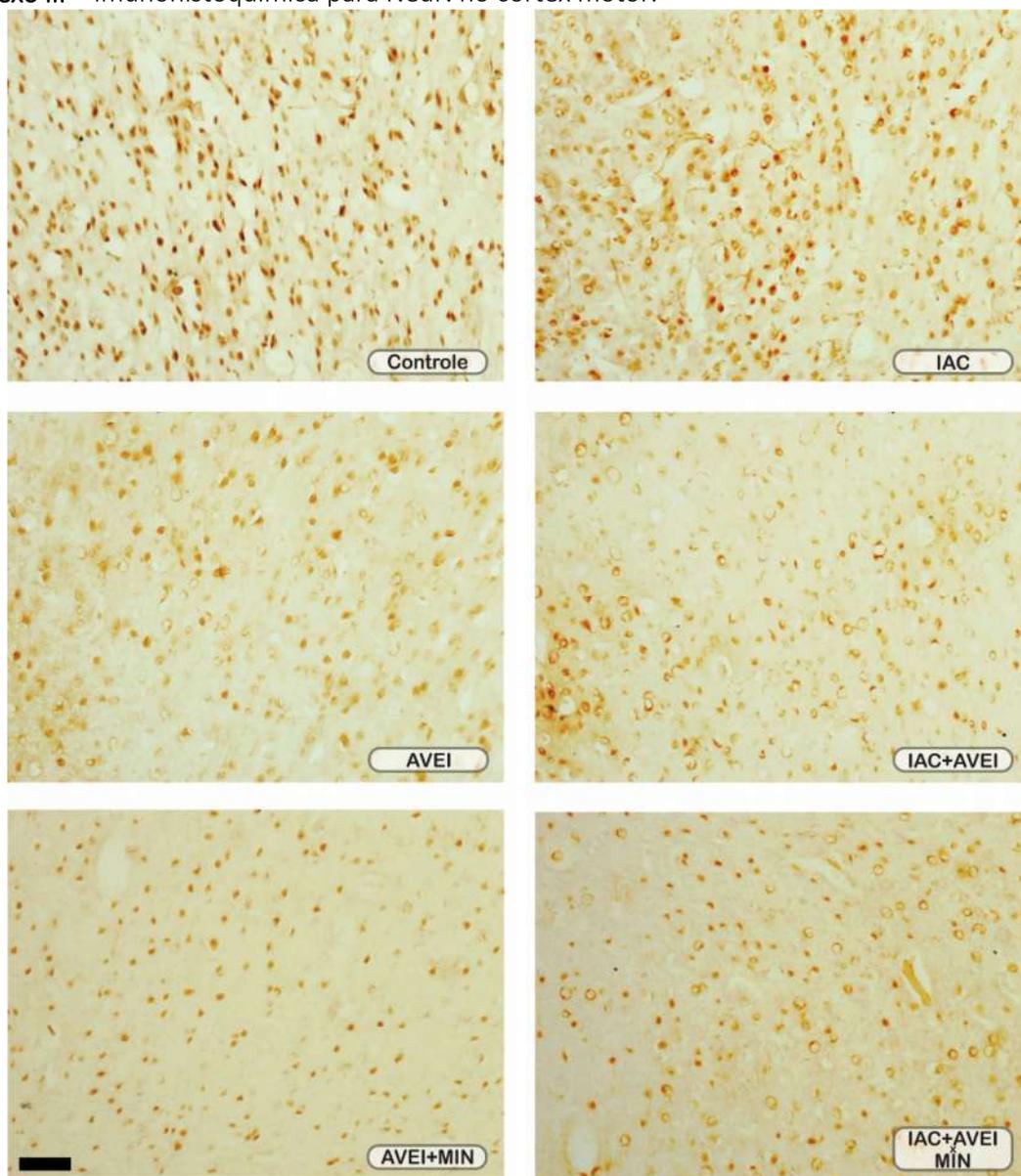


Efeitos da Isquemia focal (A), da intoxicação alcoólica crônica (IAC) e/ou do tratamento com Minociclina (MIN) sobre o córtex motor de ratas.

a. Padrão de lesão do córtex motor corado com violeta de cresila. Escala de 200  $\mu$ m.

b. Densidade celular do córtex motor. \*P<0,05 versus grupo controle/Água; #P<0,05 versus grupos Controle/IAC e grupos AVEI.

Anexo III – Imunohistoquímica para NeuN no córtex motor.

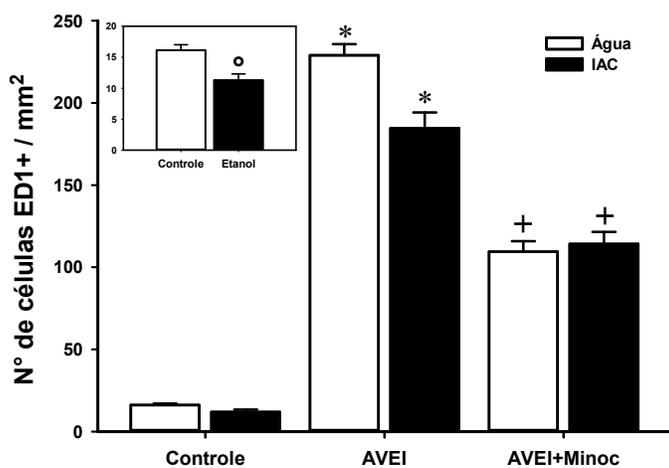
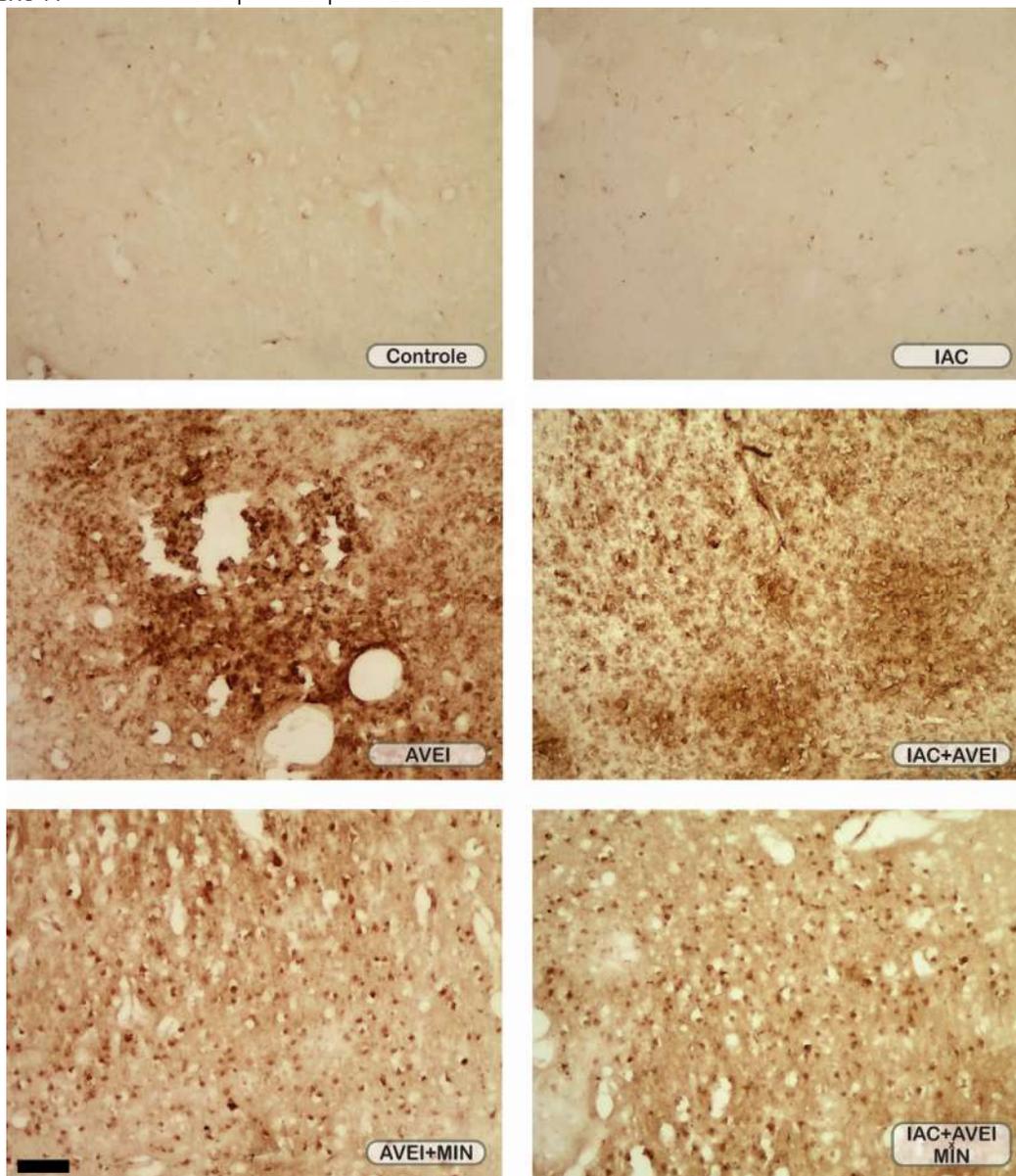


Efeitos da Isquemia focal (AVEI), da intoxicação alcoólica crônica (IAC) e/ou do tratamento com Minociclina (MIN) sobre a densidade neuronal no córtex motor de ratas.

a. Prancha com micrografias de imunohistoquímica para NeuN no córtex motor. Escala de 200  $\mu$ m.

b. Densidade neuronal do córtex motor.  
\*P<0,05 versus todos os grupos.

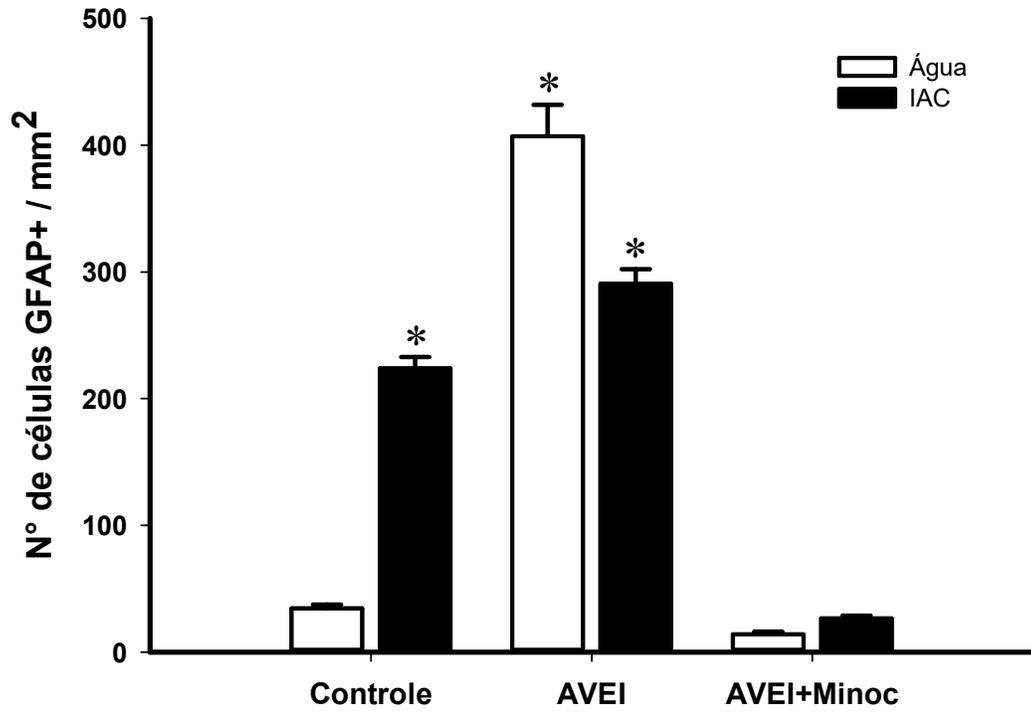
## Anexo IV – Imunohistoquímica para ED1 no córtex motor.



Efeitos da Isquemia focal (AVEI), da intoxicação alcoólica crônica (IAC) e/ou do tratamento com Minociclina (MIN) sobre a ativação microglial no córtex motor de ratas.

a. Prancha com micrografias de imunohistoquímica para ED1 no córtex motor. Escala de 200  $\mu$ m.

b. Número de células ED1+. \* $P < 0,05$  versus todos os grupos; + $p < 0,05$  versus controles; ° $p < 0,05$  versus grupo água/Controle.



Efeitos da Isquemia focal (AVEI), da intoxicação alcoólica crônica (IAC) e/ou do tratamento com Minociclina (MIN) sobre o número de células GFAP+ no córtex motor de ratas. \*P<0,05 versus todos os grupos.