

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CAROLINE SERAFIM DAGOSTIN**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO CLORIDRATO DE MINOCICLINA  
EM MODELO ANIMAL DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL  
ISQUÊMICO**

**CRICIÚMA  
2020**

**CAROLINE SERAFIM DAGOSTIN**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO CLORIDRATO DE MINOCICLINA  
EM MODELO ANIMAL DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL  
ISQUÊMICO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

**CRICIÚMA**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D127e Dagostin, Caroline Serafim.

Efeito neuroprotetor do cloridrato de minociclina em modelo animal de acidente vascular cerebral isquêmico / Caroline Serafim Dagostin. - 2020.

42 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.

Orientação: Felipe Dal-Pizzol.

1. Acidente vascular cerebral. 2. Isquemia. 3. Minociclina. 4. Ácido glutâmico. 5. Fármacos neuroprotetores. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Elisângela Just Steiner - CRB 14/1576  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 371

Com início às 09h45 (nove horas e quarenta e cinco minutos) do dia trinta de outubro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **CAROLINE SERAFIM DAGOSTIN**, sob a orientação do **Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol** e coorientado pela **Dra. Monique Michels** intitulada “**EFEITO NEUROPROTETOR DO CLORIDRATO DE MINOCICLINA EM MODELO ANIMAL DE AVC ISQUÊMICO**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Roger Walz (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 10h45 (dez horas e quarenta e cinco minutos), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 30 (trinta) de outubro de 2020 (dois mil e vinte).

**Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**  
Peruchi Coordenador Adjunto do PPGCS  
Administrativo

**Fernanda Nunes**  
Assistente



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DE OBRA**

Tese, dissertação, livro, capítulo de livro, artigo, outros

**1) DADOS DO AUTOR**

1.1 Nome: CAROLINE SERAFIM DAGOSTIN

1.2 CPF: 092.440.079-08

1.3 Vínculo com a instituição: ACADEÊMICO DE PÓS GRADUAÇÃO

(acadêmico de pós graduação *stricto sensu*, docente, pesquisador, técnico-administrativo)

**2) INFORMAÇÕES DA OBRA**

2.1 Identificação da obra:

TESE

(tese, dissertação, livro, capítulo de livro, artigo, outros)

2.2 Título da obra: EFEITO NEUROPROTETOR DO CLORIDRATO DE MINOCICLINA EM MODELO ANIMAL DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO

Na qualidade de titular dos direitos autorais relativos à obra acima descrita, o autor, com fundamento no artigo 29 da Lei n. 9.610/1998, autoriza a UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, a disponibilizar gratuitamente sua obra, sem ressarcimento de direitos autorais, para fins de leitura, impressão e/ou *download* pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada pela UNESC, nas seguintes modalidades: a) disponibilização impressa no acervo da Biblioteca Prof. Eurico Back; b) disponibilização em meio eletrônico, em banco de dados na rede mundial de computadores, em formato especificado (PDF); c) Disponibilização pelo Programa de Comutação Bibliográfica – Comut, do IBICT (Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia), órgão do Ministério de Ciência e Tecnologia.

Criciúma, 31 de OUTUBRO de 2020.

Assinatura:

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo e todos, sempre, agradeço a Deus pela oportunidade e pelos conhecimentos que me foram permitidos receber. Agradeço à Ele cada dificuldade, desafio a ser vencido e oportunidade de conviver com meus colegas de laboratório.

Agradeço aos meus pais e aos amigos que, direta ou indiretamente, ajudaram na composição deste trabalho, estejam eles cientes ou não do cunho e magnitude de suas ações.

E agradeço também aos meus colegas de equipe do Fisiopat e funcionários da UNESC, pelas lições não apenas de convivência, mas também de conhecimento. À minha co-Orientadora Dra. Monique Michels, pois seu apoio e importância neste projeto foram sem precedentes, tenho-lhe com forte admiração e carinho. E ao meu orientador Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, pela paciência e ciência em como encaminhar as situações – apenas observando-o e escutando-o eu cresci interiormente, e espero que meus próximos passos lhe revelem o respeito e admiração que tenho por sua pessoa.

Por fim, à CAPES e CNPQ, pela concessão da taxa e fomento de meus estudos e projeto.

## RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é a segunda maior causa de morte no mundo e a principal causa médica de incapacidade adulta adquirida. Aproximadamente 80% dos AVCs são de natureza isquêmica e resultam da oclusão tromboembólica de uma artéria cerebral ou seus ramos. Vários mecanismos já foram identificados como sendo importantes para a fisiopatologia do AVC isquêmico, entre eles a insuficiência energética, excitotoxicidade glutamatérgica, lesão oxidativa, ativação de caspases e inflamação, caracterizada pela produção de mediadores inflamatórios e ativação microglial. A minociclina, uma tetraciclina com efeitos anti-inflamatórios, emergiu como um agente terapêutico promissor para o tratamento de AVC no processo de recuperação neurológica. Neste sentido, o objetivo desse projeto foi avaliar o efeito do cloridrato de minociclina sob comportamento, área de infarto, toxicidade glutamatérgica e inflamação em modelo animal de AVC isquêmico. Ratos *Wistar* (60 dias) foram submetidos a MCAO (do inglês, *Middle Cerebral Artery Occlusion*), cirurgia que consiste na oclusão da artéria cerebral média por 90 minutos seguida por reperfusão, que mimetiza os efeitos do AVC. Animais foram divididos em 4 grupos 1) Sham + salina (n=20); 2) Sham + minociclina (n=20); 3) AVC + salina (n=30); 4) AVC + minociclina (n=30). Ao final da cirurgia, minociclina (90 mg/kg) ou solução salina (0,9%) foram administradas via intraperitoneal. O tratamento permaneceu até 48 horas na dose de 50mg/kg 12/12h. Os animais foram randomizados em grupos de 48 horas ou 10 dias e então submetidos a scores neurológicos, testes de atividade locomotora e *rotarod*. Após os testes, os animais foram mortos e foi realizada a remoção das fatias do encéfalo para análise do volume do infarto e estriado e área de penumbra para níveis de citocinas e glutamato. A administração de minociclina proporcionou proteção significativa na redução do volume de infarto em 48h e 10 dias. Correlações positivas foram observadas entre o volume de infarto e o escores neurológicos de Clarck e Zea-longa, denotando não apenas melhora clínica mas também diminuição da lesão isquêmica. Além disso, ocorre recuperação da atividade locomotora no grupo tratado. O tratamento com minociclina exibe propriedades anti-inflamatórias, aumentando os níveis de interleucina (IL)-10 na região do estriado e da penumbra e níveis reduzidos de TNF- $\alpha$  e IL6 no estriado, além disso, reduzem a toxicidade do glutamato 10 dias após o tratamento. Postula-se que os efeitos anti-inflamatórios da minociclina têm um papel importante na melhoria da disfunção neurológica e na recuperação da atividade locomotora no AVC.



**Palavras-chave:** Acidente vascular cerebral; Glutamato; Isquemia; Minociclina.

## ABSTRACT

Stroke is the second leading cause of death in the world and the leading medical cause of acquired adult disability. Approximately 80% of strokes are of ischemic origin and result from thromboembolic occlusion of a cerebral artery or its branches. Several mechanisms have already been identified as being important for the pathophysiology of ischemic stroke, including energy failure, glutamatergic excitotoxicity, oxidative damage, activation of caspases and inflammation, characterized by the production of inflammatory mediators and microglial activation. Minocycline, a tetracycline which has anti-inflammatory effects, has emerged as a promising therapeutic agent for the treatment of stroke in the neurological recovery process. In animal models it has been shown to be neuroprotective and to reduce the size of cerebral infarction. Thus, the aim of this project was to evaluate the effect of minocycline on behavior, area of infarction, glutamatergic toxicity and inflammation in an animal model of ischemic stroke. Wistar rats (60 days) were submitted to MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion), a surgery that consists of occlusion of the middle cerebral artery for 90 minutes followed by reperfusion, which mimics the effects of stroke. Animals were divided into 4 groups 1) Sham + saline (n=20); 2) Sham + minocycline (n=20); 3) stroke + saline (n=30); 4) Stroke + minocycline (n=30). At the end of the surgery, minocycline (90 mg/kg) or saline solution (0.9%) was administered intraperitoneally. The treatment remained for up to 48 hours at a dose of 50mg/kg 12/12h. The animals were randomized into groups of 48 hours or 10 days and then submitted to neurological scores, locomotor activity tests and rotarod. After the tests, animals were killed and the slices of the brain were removed for analysis of the infarct and striatum volume and penumbra area for cytokine and glutamate levels. The administration of minocycline provided significant protection in reducing the infarction volume in 48 hours and 10 days. Positive correlations were observed between the volume of infarction and the Clark and Zea-longa score, demonstrating not only better clinical recovery but also smaller infarct areas. In addition, locomotor activity recovers in the treated group. Minocycline treatment exhibits anti-inflammatory properties, increasing levels of IL-10 in the striatum and penumbra region and reduced levels of TNF and IL6 in the striatum, in addition, reducing glutamate toxicity 10 days after treatment. It is postulated that the anti-inflammatory effects of minocycline play an important role in improving neurological dysfunction and in recovering locomotor activity in stroke.

**Key-words:** Stroke; Glutamate; Ischemia; Minocycline.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 DEFINIÇÕES E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVC ISQUÊMICO.....	11
1.3 COMPROMETIMENTO NEUROLÓGICO .....	12
1.4 MODELO ANIMAL .....	14
1.5 CLORIDRATO DE MINOCICLINA .....	15
1.6 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DO MODELO DE ESTUDO.....	17
2. OBJETIVOS.....	17
172.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 18
3 METODOLOGIA.....	18
3.1 ANIMAIS .....	18
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	19
3.3 TRATAMENTO.....	20
3.4 ANÁLISES.....	20
3.4.1 ESCORES NEUROLÓGICOS DA FUNÇÃO NEUROLÓGICA.....	20
3.4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	21
3.4.2.1 ATIVIDADE LOCOMOTORA .....	21
3.4.2.2 ROTAROAD .....	21
3.4.3 VOLUME DA LESÃO CEREBRAL .....	22
3.4.4 NÍVEIS DE CITOCINAS .....	22
3.4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) .....	23
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	23
4. RESULTADOS .....	24
5 DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO .....	31
REFERÊNCIAS .....	32
APÊNDICE .....	39
ANEXO .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DEFINIÇÕES E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A tradicional definição de acidente vascular cerebral (AVC) é clínica e baseia-se na perda abrupta de função neurológica focal por infarto ou hemorragia em alguma área anatômica relevante do cérebro, medula espinal ou retina (Campbell et al., 2019). O AVC é uma síndrome já descrita na literatura desde a antiga Grécia por Hipócrates, chamado por centenas de anos de apoplexia. Seu termo em inglês, “*stroke*”, seria um ataque da “mão de Deus”, causando alterações comportamentais e orgânicas, muitas levando a morte. Seu aparecimento agudo, severidade e imprevisibilidade possuem impactos físicos e emocionais para o paciente e seus familiares (History of Stroke, 2004).

O AVC é a segunda maior causa de morte no mundo e uma das principais causas de incapacidade, com uma incidência crescente nos países em desenvolvimento (Campbell et al., 2019). O AVC pode ser amplamente classificado em isquêmico e hemorrágico, sendo que o AVC isquêmico é definido como infarto do cérebro ou medula espinhal e representa ~ 71% de todos os tipos de AVC globalmente (Feigin et al., 2018).

O AVC afeta 13,7 milhões de pessoas em todo o mundo por ano e é a segunda principal causa de morte. Estima-se que 1 em cada 4 adultos experimentará um AVC durante a vida e existem >80 milhões de sobreviventes de AVC globalmente (Feigin et al., 2018). Esses sobreviventes de AVC representam uma população de alto risco e são o foco de estratégias de prevenção secundária. No Brasil, estudos sobre prevalência e incidência de AVC são escassos; no entanto, um estudo longitudinal mostrou uma incidência de 1,7% em um acompanhamento de 6 anos (Lotufo 2005). Muitos estudos foram desenvolvidos no Brasil com o objetivo de determinar a prevalência, fatores associados e formas de prevenção para o AVC. Em um desses estudos, o número de pessoas com AVC foi de 2231 milhões, resultando em uma prevalência de 1,6% nos homens e 1,4% nas mulheres (Bensenor et al., 2015).

Existem fatores de risco modificáveis e não modificáveis para a ocorrência de isquemia cerebral. O *clinical trial* INTERSTROKE, realizado em 32 países em 2016, identificou que dentre os 91,5% da população estudada, os principais fatores de risco modificáveis, que seguem: a pressão arterial (especialmente se mantida abaixo de 160/90 mmHg), sedentarismo, altos níveis de apolipoproteína-B, dieta, relação cintura versus quadril aumentada, estresse e depressão, tabagismo, diabetes mellitus tipo 2, consumo de

álcool e causas cardíacas – em especial a fibrilação atrial (Zeng et al., 2017). Os fatores genéticos, ou seja, não modificáveis, também são importantes na patogênese do AVC, embora a causa da maioria seja multifatorial e envolva, também, influência ambientais (Andersen et al., 2009). A síndrome começa abruptamente e os déficits neurológicos decorrentes são graves e persistentes, impactando a qualidade de vida dos pacientes acometidos e também das pessoas que convivem (Sohlberg e Mateer, 2009).

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVC ISQUÊMICO

O processo patológico subjacente no AVC pode ser uma isquemia ou hemorragia, que geralmente se origina de uma lesão arterial. De acordo com Tambara (2006), aproximadamente 85% dos AVCs são de origem isquêmica e 15% de origem hemorrágica. No AVC isquêmico, a interrupção do fluxo sanguíneo para o cérebro priva neurônios, glia e células vasculares da glicose e do oxigênio. A menos que o fluxo seja restaurado prontamente, esse processo leva a morte isquêmica do tecido (Vasconcelos et al., 2004).

A fisiopatologia da isquemia cerebral é complexa, pois envolve um processo que se desenvolve durante um período, afeta o cérebro de modo não uniforme e tem como alvo múltiplos tipos celulares. No entanto, vários mecanismos já foram identificados como sendo importantes para a fisiopatologia do AVC isquêmico, entre eles a insuficiência energética e desregulação de cálcio, comprometendo a função mitocondrial (Nagahiro et al., 1998), excitotoxicidade pela estimulação da liberação excessiva do glutamato (Clarkson et al., 2010), lesão oxidativa e nitrosativa ocasionada pelo excesso na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Brown, 2010), ativação de caspases levando a apoptose (Broughton et al., 2009) e por fim a inflamação, caracterizada pela produção excessiva de mediadores inflamatórios e consequente ativação microglial (Ishikawa et al., 2004; Mizuma et al., 2017; Zhang et al., 2010).

Com a oclusão do vaso cerebral, o território arterial correspondente terá diminuição da entrega de oxigênio e glicose, levando a uma disparidade entre a energia que o tecido necessita para seus processos metabólicos e o que está sendo ofertado após a diminuição do fluxo cerebral local, instalando-se então a hipóxia seguida da isquemia (Campbell et al., 2019). A despolarização anóxica, que é a despolarização progressiva dos neurônios durante estados de baixo suprimento sérico, comumente chamado de falha da bomba de íons na membrana, libera neurotransmissoras intracelulares e diminui a

recaptação de glutamato pelo receptor NMDA, levando ao aumento de glutamato extracelular (Campbell et al., 2019; Chamorro et al., 2016). Este é o principal ponto de corte onde o tecido deixa de ser hiperpolarizado e eletrofisiologicamente silencioso para um estado superdespolarizado e sem gradiente de membrana, pronto para iniciar as cascatas de morte celular. Pelos receptores NMDA entram íons  $\text{Ca}^{2+}$ , que também é liberado dentro da célula por meio de receptores metabotrópicos causando um grande influxo de cálcio pouco tempo após a isquemia. Mecanismos intracelulares que possuem o cálcio como mensageiro são ativados. A ativação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) leva a produção de óxido nítrico e a formação de radicais livres. O cálcio também dá início a mecanismos intracelulares de apoptose e morte celular, não afetando apenas o core isquêmico ou a área de penumbra, mas também por meio da degeneração Walleriana, onde há perda de massa branca e desmielinização em tratos corticais e locais distantes ao foco isquêmico (Campbell et al., 2019; Chamorro et al., 2016).

O estresse oxidativo e a perda de gradiente iônico também afeta a mitocôndria, formando poros em sua membrana e levando a liberação de citocromo C, causando ativação de caspases e fragmentação do DNA, que levam a apoptose. Este material genético, bem como outras organelas e proteínas leva a ativação de uma reação inflamatória asséptica por meio de *damaged associated molecular patterns* (DAMPs), podendo ser de qualquer célula do sistema nervoso central. Estes DAMPs, que incluem adenosina tri-fosfato (ATP), *high mobility group box 1* (HMGB1), proteínas da família peroxiredoxinas em meio a tantos outros, podem tanto agir de modo a induzir a inflamação, ativando interleucinas e citocinas pró inflamatórias, bem como podem induzir a neuroproteção em determinados casos.

### 1.3 COMPROMETIMENTO NEUROLÓGICO

A neuroinflamação é um evento secundário importante após o AVC (Gomes-Leal et al., 2015; Tóth et al., 2016). O dano isquêmico desencadeia uma intensa resposta inflamatória com componentes humorais e celulares, iniciando uma série de ações prejudiciais (Gomes-Leal et al., 2015; Tóth et al., 2016). Em questão de horas, várias citocinas são liberadas por neurônios e células gliais (Lambertsen et al., 2012), o que aumenta o recrutamento de neutrófilos (Souza-Rodrigues et al., 2008; Easton, 2013), linfócitos (Liesz et al., 2009; Brait et al., 2012) e ativação de microglia/macrófagos (Yrjanheikki et al., 1999; Morioka et al., 1993; Franco et al., 2012). As primeiras células

a responder ao insulto são a micróglia, seguida por neutrófilos que exacerbam o estresse oxidativo e os danos na barreira hematoencefálica (Justicia et al., 2003; Kolaczowska et al., 2013). As células gliais, depois de ativadas, liberam mediadores que atraem mais neutrófilos, monócitos e linfócitos (Pocock et al., 2007).

No sentido de reduzir o dano causado pelo AVC ao SNC, há uma janela terapêutica para o tratamento que possibilita a redução dos processos patológicos da isquemia. Tanto no local isquêmico, como na zona de penumbra isquêmica que circunda o núcleo de uma região afetada, a lesão celular é potencialmente reversível e a sobrevivência celular pode ser prolongada, mas para isso o fluxo sanguíneo precisa ser restaurado rapidamente, caso contrário, a morte celular progride e o infarto se expande. A morte do tecido penumbral está associada a um resultado clínico ruim para o paciente (del Zoppo et al., 2011).

As intervenções que melhoram a recuperação neurológica após o AVC geralmente estão associadas a aumentos na plasticidade neuronal peri-infarto que contribuem para melhores resultados (Pekna et al., 2012; Benowitz et al., 2010; Hermann et al., 2012). As células da glia são os principais determinantes do ambiente peri-infarto e uma influência fundamental na capacidade de alteração da conectividade neuronal. A morte de células na região do infarto ativa a micróglia no tecido viável circundante, produzindo mudanças marcantes na morfologia e na expressão gênica iniciadas nas primeiras 24 horas após o AVC (Morrison et al., 2013; Yenari et al., 2010). Alterações nas propriedades astrocíticas tornam-se proeminentes nos primeiros dias, desencadeadas em parte por substâncias liberadas da microglia, incluindo citocinas e quimiocinas (Liu et al., 2016; Burda et al., 2014; Sofroniew 2015; Sims et al., 2017). Astrócitos e micróglia também liberam muitas outras moléculas que podem influenciar a recuperação (Ma et al., 2017; Liu et al., 2016; Sofroniew 2015). A complexidade da resposta é aprimorada ainda mais pela migração de células periféricas para a área do infarto e o tecido circundante (Zhou et al., 2013). Isso inclui monócitos que se tornam macrófagos teciduais e compartilham muitas propriedades com a microglia residente.

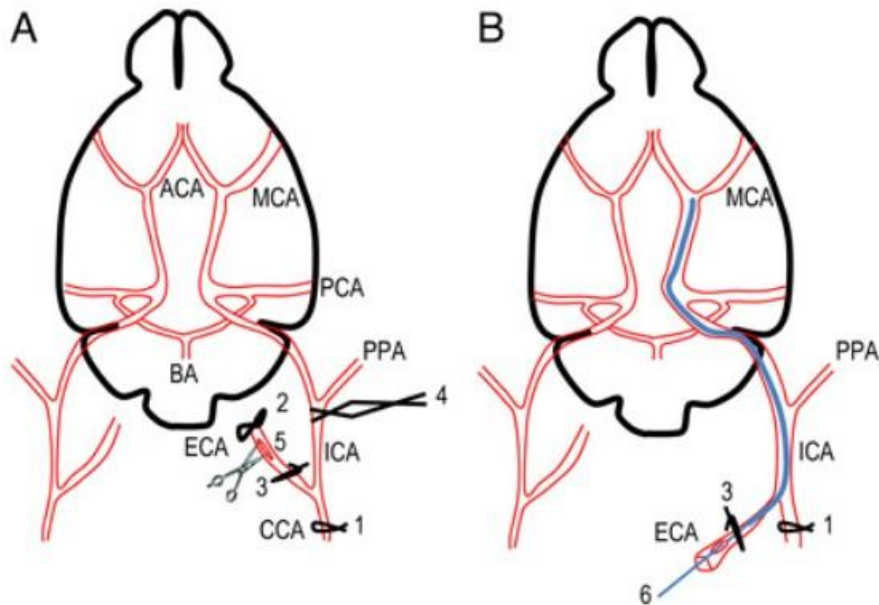
Neste sentido, o principal objetivo do tratamento do AVC agudo é recuperar o dano causado na penumbra isquêmica e o volume de tecido hipoperfundido, não-funcional, mas ainda viável, ao redor do núcleo infartado.

#### 1.4 MODELO ANIMAL



Modelos animais de isquemia cerebral têm sido importantes para aumentar a compreensão da fisiopatologia e dos mecanismos envolvidos no AVC. (Smith et al, 2015). De acordo com Jin et al. (2014), a artéria cerebral média (ACM) é a mais frequentemente ocluída em AVC isquêmico em seres humanos, cerca de 80% dos casos (Rousselet et al. 2012). Tendo como base esta artéria, muitos modelos animais de AVC isquêmicos foram estabelecidos. Pesquisas desenvolveram dois tipos principais de modelos de isquemia em ratos por oclusão da ACM: modelo MCAO (*Middle Cerebral Artery Occlusion*) embólico e modelo de MCAO de sutura (figura 1). O modelo embólico foi desenvolvido pela primeira vez em ratos por Overgaard et al., (1992) e ainda caracterizada por Dinapoli et al., (2006). Ao contrário da oclusão permanente, isquemia focal transitória envolve a retirada do fio para permitir a reperfusão de todo o território da ACM (Ansari et al., 2011; Fluri et al., 2015; McBride et al., 2017). Já o modelo de sutura foi desenvolvido por Koizume e colaboradores em 1986. Tem sido amplamente utilizada para identificar mecanismos moleculares de lesão cerebral resultantes de AVC isquêmico e possíveis modalidades terapêuticas. Uma sutura intraluminal é introduzida no vaso que afeta a região desejada, no caso deste estudo, a cerebral média, e então retirado após um período de tempo específico para imitar a reperfusão espontânea (Rousselet et al. 2012).

O modelo animal de MCAO é importante pela possibilidade de analisar neuroproteção, neuroreparo e morte celular, juntamente com a sutura da artéria carótida comum (ACC) pode-se diminuir a variabilidade do volume do infarto. Contudo não é possível repetir os mesmos aspectos do AVC humano, devido à complexidade heterogênea dessa patologia, que envolve fatores de risco genéticos, ambientais e de estilo de vida. (Fluri et al. 2015; McBride; Zhang 2017; Rousselet et al. 2012).



**Figura 1: Esquema do modelo experimental, utilizando fio de sutura intraluminal.** (A) Esquema ilustrativo de cérebro de rato e artérias cerebrais, mostrando suturas sucessivas e clips para preparar a introdução do fio de sutura intraluminal. (B) Representação da posição do fio de sutura nas artérias. O fio de sutura é inserido na ACE, percorre até ACC e é inserido na ICA até chegar a MCA. CCA, artéria carótida comum; ECA, artéria carótida externa; ICA, artéria carótida interna; PPA, artéria pterigopalatina; PCA artéria comunicante posterior; MCA, artéria cerebral média, ACA artéria cerebral anterior; BA, artéria basilar. Fonte: (Rousselet et al. 2012).

### 1.5 CLORIDRATO DE MINOCICLINA

A minociclina consiste em um antibiótico bacteriostático de amplo espectro e de longa ação, durando 16-18 horas no corpo humano. É um derivado de tetraciclina semissintético e é usado como um medicamento antimicrobiano. Além de seus efeitos antimicrobianos, foi reconhecido que possui efeitos anti-inflamatórios, antiapoptóticos e neuroprotetores em estudos experimentais e clínicos de diferentes desordens neurológicas, incluindo lesão neuronal isquêmica (Garrido-Mesa et al., 2013; Sonmez et al., 2013). A minociclina exerce efeitos anti-inflamatórios reduzindo a apoptose e inibindo a expressão da polimerase ribose 1 de poliadenossulfato difosfato (PARP) e metaloproteinases da matriz (MMP) após isquemia cerebral focal, como relatado em modelos animais de AVC (Murata et al., 2008).

A minociclina é um inibidor muito eficaz da ativação da microglia em modelos experimentais de distúrbios neurais agudos em animais (Yrjanheikki et al., 1999; Guimaraes et al., 2010). Além disso, a minociclina possui ações pleiotrópicas, incluindo proteção mitocondrial, inibição das caspases 1 e 3 e redução da atividade das MMPs (Yong et al., 2004). Outro importante mecanismo de ação da minociclina é a inibição da HMGB-1 que atua como um produtor de citocinas com ações inflamatórias das células microgliais (Hayakawa et al., 2008).

Estudos mostram que a inibição da ativação microglial com minociclina diminui a área do infarto tanto no córtex quanto no estriado após a MCAO (Yrjanheikki et al., 1999; Franco et al., 2012; Cardoso et al., 2013). Por outro lado, vários trabalhos mostram que a ativação microglial pode ser benéfica após algum tempo do evento isquêmico. (Neumann et al., 2006; 2008; Sierra et al., 2013; Lalancette-Hebert et al., 2007). Esses efeitos neuroprotetores envolvem a quimiotaxia de neutrófilos (Neumann et al., 2008), a modulação da inflamação excessiva (Lalancette-Hebert et al., 2007) e a liberação de fatores de crescimento (Thored et al., 2009).

Vários estudos sugerem que a minociclina reduz a morte celular por apoptose após AVC (Franco et al., 2012; Cardoso et al., 2013), lesão excitotóxica (Guimaraes et al., 2010; Heo et al., 2006) e lesão medular (Stirling et al., 2004; Yune et al., 2007). O mecanismo antiapoptótico primário é a inibição direta da liberação de citocromo C pelas mitocôndrias (Matsukawa et al., 2009). Além disso, Yrjanheikki et al (1999) mostrou em seus estudos que a minociclina reduz não apenas a inflamação em modelo animal de AVC, mas também o tamanho do infarto causado. A literatura relata que minociclina pode proteger o cérebro contra estresse oxidativo (Morimoto et al., 2005; Pi et al., 2004; Zhu et al., 2002) além disso, minociclina também pode suprimir as citocinas e a ativação da microglia no cérebro lesado (Yrjänheikki et al., 1998; 1999; Bye et al., 2007).

A minociclina emergiu como um agente terapêutico promissor para o tratamento de AVC no processo de recuperação neurológica. Em modelos animais de isquemia cerebral, foi demonstrado ser neuroprotetor (Yrjanheikki et al., 1998) e reduzir o tamanho do infarto cerebral (Xu et al., 2004). Ao investigar as propriedades anti-inflamatórias da minociclina em vários modelos de doenças neurológicas, foi detectado um aumento na neurogênese paralelamente a redução da inflamação (Ekdahl et al., 2003, Rasmussen et al., 2011, Das et al., 2011). Wen et al (2015) apresenta em seu estudo um aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*) em cérebro de animais submetidos a modelo animal de AVC e

tratados com minociclina. A proteína BDNF está relacionada a processos anti-apoptóticos em modelo animal de AVC isquêmico (Sheikh et al., 2010; Chen et al., 2017).

## 1.6 HIPOTESE E JUSTIFICATIVA DO MODELO E ATUAL ESTUDO

Ainda não há inovações diretas nas terapias farmacológicas para o tratamento do AVC além de intervenções diretamente no trombo causador da isquemia, ou planos terapêuticos que possam prevenir maiores danos quanto a injúria por reperfusão. A minociclina é um fármaco já bastante conhecido e com efeitos colaterais bem estabelecidos pela literatura, apresentando segurança em seu uso. Teoricamente, esta diminuiria não apenas a excitotoxicidade glutamatérgica e apresentaria um melhor perfil de ativação microglial, como também melhoraria o padrão da lesão da área penumbral, com um perfil de citocinas otimizado e anti-inflamatório, acarretando assim melhora nos parâmetros comportamentais e nos *scores* funcionais realizados nos animais. Ainda que existam modelos *in vitro* para AVC, onde células são colocadas em cultura e é realizada uma privação de oxigênio, mimetizando o AVC isquêmico, o MCAO permanece o padrão ouro para mimetizar o AVC isquêmico de forma ímpar, representando bem o que ocorre na célula neuronal e mimetizando a lesão de isquemia e reperfusão, uma vez que prioriza a perviabilidade da carótida comum e interna, diferentes de outros modelos disponíveis. Um dos nossos objetivos, também, é avaliar a inflamação sistêmica através da análise de citocinas e quantificar a área de infarto, o que não seria possível em um modelo celular mais simples.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito neuroprotetor do cloridrato de minociclina em modelo animal de AVC isquêmico.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Analisar o comportamento através de scores neurológicos e também de atividade locomotora e *rotarod* de ratos *Wistar* submetidos a modelo de AVC isquêmico, tratados ou não com minociclina;

-Avaliar os níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10) em cérebro de ratos *Wistar* submetidos a modelo de AVC isquêmico, tratados ou não com minociclina;

-Quantificar volume da lesão cerebral em fatias cerebrais de ratos submetidos a modelo de AVC isquêmico, tratados ou não com minociclina;

-Avaliar níveis de glutamato em cérebros de animais submetidos a modelo de AVC isquêmico, tratados ou não com minociclina.

- Correlacionar os scores neurológicos aplicados com a área de lesão cerebral formada de animais submetidos a modelo de AVC isquêmico, tratados ou não com minociclina.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados neste estudo ratos *Wistar*, machos, com peso corporal de 250 a 350 g, com 60 dias de vida, provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), onde permaneceram alojados em local fresco e arejado em um ciclo 12 horas claro/escuro, a uma temperatura de 23°C  $\pm$  1°C, com alimento e água sempre disponíveis.

A utilização dos animais seguiu protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade e seguirá os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). O número de animais em cada grupo foi baseado em estudos pré-clínicos, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados, com uma variância de no máximo 10% entre as médias. Os procedimentos foram aceitos pelo Comitê de Ética no Uso Animal, UNESC, Brasil, pelo protocolo número: 029/2019-1 (parecer em ANEXO).

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia Experimental e no Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil.

### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Animais foram divididos em 4 grupos 1) Sham + salina (n=20); 2) Sham + minociclina (n=20); 3) AVC + salina (n=30); 4) AVC + minociclina (n=30). Os animais foram anestesiados com 5% de isoflurano (1L/min de O<sub>2</sub> e 1L/min O<sub>2</sub> ambiente), e mantidos sob anestesia utilizando o fluxo de 1-2% de isoflurano para a indução de AVC.

Para indução de MCAO, foi feita tricotomia na região cervical ventral com creme depilatório Veet®, após foi realizada assepsia com cloxeridina 4%, e logo após administrado 0,2 mL de xilocaína (0,5%) por via subcutânea ao longo do local da incisão. A incisão foi realizada no local asséptico na linha média ventral, até expor as artérias carótidas internas, externas e comuns (ACI, ACE, ACC), e veia jugular. A ACE foi amarrada com um fio de sutura seda 6-0 e outro fio colocado frouxamente em torno da ACE, cliques microcirúrgicos foram colocados nas ACC e ACI próximos da bifurcação, uma arteriotomia inicial parcial foi feita entre os dois laços de sutura de seda sobre a ACE, foi introduzido um monofilamento de nylon (4-0) de sutura de comprimento de 2.2 – 3.0 cm, com ponta revestida de silicone arredondada, do lúmen do ACE para baixo em direção ao ACC onde o clipe microcirúrgico está localizado. Foi cortado a porção restante da ACE (no local da arteriotomia parcial) para liberar a ponta e posicioná-la abaixo da bifurcação da ACE e ACI, isso permitiu mais facilmente a sutura intraluminal a deslizar para o ACI, facilitando segurar o fio de seda ao redor da ponta ACE para fixar o fio de nylon intraluminal e prevenir o sangramento, e remover o clipe microvascular do ACI, avançando o fio de nylon no lúmen da ACI até a ACM. Este comprimento é, tipicamente, de 18-20 mm e é a razão para a colocação de uma dobra no fio de sutura antes da inserção. Depois que um comprimento variável de sutura de nylon é inserido, a resistência pode ser sentida. Em seguida, a sutura foi puxada para trás e curvada para continuar ao longo do ACI, de forma medial, inserindo o fio de nylon até se sentir resistência durante e após os 2 cm. Neste ponto, o fio de sutura intraluminal bloqueia a origem da ACM (Uluç et al., 2011).

O período de interrupção do fluxo sanguíneo foi de 90 minutos. Nos animais do grupo sham não houve ligamento das artérias. Todos os procedimentos cirúrgicos foram

realizados com colchão térmico contendo termômetro acoplado para regulação da temperatura corporal em  $\pm 37^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 TRATAMENTO

Ao final da cirurgia MCAO, minociclina (90 mg/kg) ou solução salina (0,9%) foi administrada intraperitoneal. O tratamento permaneceu até 48 horas na dose de 50mg/kg 12/12h. O protocolo é semelhante aos tratamentos utilizados nos estudos de Chu et al. (2010) e Kim et al. (2009). Os animais foram randomizados em grupos de 48 horas ou 10 dias e então foram submetidos a scores neurológicos e testes comportamentais de atividade locomotora e *rotarod*. Logo após os testes, os animais foram eutanasiados por decapitação e foi realizada a remoção das fatias do encéfalo para análise do volume do infarto e estriado e área de penumbra para as demais dosagens bioquímicas (parâmetros inflamatórios e toxicidade glutamatérgica).

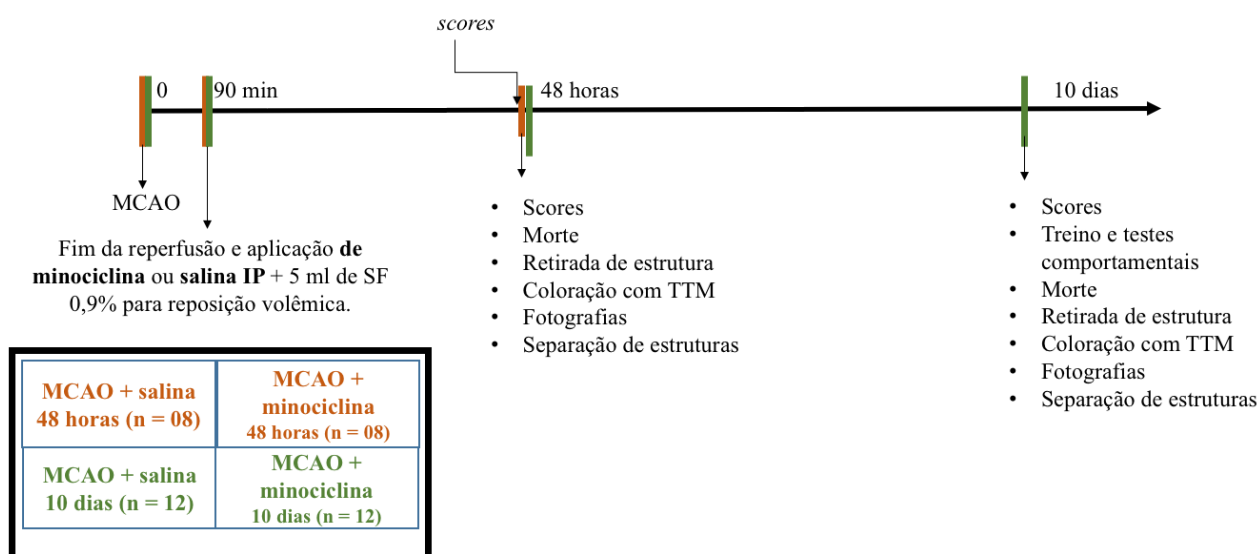


Figura 2: Representação esquemática do desenho experimental

### 3.4 ANÁLISES

#### 3.4.1 Scores para avaliação da função neurológica

Após 48 horas da indução do AVC isquêmico os animais foram submetidos a escores neurológicos seguindo os critérios de Zea Longa (Uluc et al., 2011; Li et al., 2018) e de Clark's (Clarck et al., 1997).

Para escore de Zea Longa, foram adotados os seguinte critérios:

0	Nenhum sintoma de déficit neurológico, atividade normal.
1	caudas invertidas, incapazes de esticar as patas contralaterais
2	vira para o lado oposto; rasteja
3	o corpo inclinado para o lado oposto enquanto caminha
4	não é capaz de andar, perda de consciência

Zea Longa (Uluc et al., 2011; Li et al., 2018).

O escore de Clarck abrange a soma de duas escalas (geral e de déficit focal). As pontuações para esta escala variam de 0 a 28 e representam a soma dos resultados de todas as categorias para cada escala.

A escala de déficit geral avalia ereção dos pelos (0–2), orelhas (0–2), olhos (0–4), postura (0–4), atividade espontânea (0–4) e comportamento epilético (0–12). A escala de déficit focal avalia a simetria corporal (0–4), a marcha (0–4), subida em uma superfície de 45° (0–4), o comportamento circulante (0–4), a simetria dos membros dianteiros (0–4), circulação obrigatória (0–4) e resposta dos bigodes a um leve toque (0–4). Os animais que recebem pontuação > 21 na escala de déficit focal devem ser excluídos do estudo.

### 3.4.2. Testes comportamentais

Após 10 dias da indução de MCAO, os animais foram avaliados usando testes de atividade locomotora (*rotarod* e tarefas de campo aberto; descritas em detalhes abaixo). O investigador foi cego para o cronograma de randomização animal.

#### 3.4.2.1 Atividade locomotora

Para avaliar a atividade locomotora, os animais foram submetidos a um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo três de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais são cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explora livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após os animais voltam para a caixa moradia. Os números de



cruzamentos (*crossing*) através das linhas pretas e o número de levantamentos (*rearings*) são avaliados (Vianna et al., 2000).

#### 3.4.2.2. Rotarod

O aparelho *rotarod* consiste em uma haste que gira a uma velocidade constante (25 rpm). Animais com danos isquêmicos ou hemorrágicos tendem a cair mais cedo do que animais sem insulto, analisando assim a capacidade de locomoção, mobilidade e equilíbrio do animal (Kheirbek et al., 2009). O animal é posicionado na barra e assim que começa a caminhar o tempo é marcado. O tempo em que o animal permanece na barra foi registrado, sendo que o tempo máximo de permanência no aparelho foi de 180 segundos. O tempo da latência da primeira queda também foi verificada. Obtendo-se assim uma média entre o tempo de latência e número de quedas no aparato.

#### 3.4.3. Volume da lesão cerebral

Logo após os testes comportamentais animais foram mortos por decapitação e cérebro foi removido para determinação do volume da lesão/infarto cerebral, que foi quantificado. Essa medida é importante pois confirma o modelo. O 2,3,5-*triphenyltetrazolium chloride* (TTC) é um reagente que cora a região cerebral que não sofre hipóxia, portanto, a parte danificada pela isquemia fica branca e a parte integra fica rosa/vermelha. Secções coronais (2 mm) de cérebro foram submetidas a TTC e coradas nas regiões que não sofreram hipóxia, com solução de cloreto de 0,1% de TTC, após o tecido foi fixado em 4% de formaldeído. Fotos do tecido cerebral foram registradas e o tamanho da área de infarto não corado foi analisado utilizando o software *ImageJ*.

#### 3.4.4. Níveis de citocinas

Foi mensurado nos tecidos cerebrais, estriado e penumbra, os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10 através de Kits comerciais da R&D Systems (Minneapolis, MN / USA), conforme recomendação do fabricante.

### 3.4.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O conteúdo de glutamato no cérebro de ratos foi estimado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; De Benedetto et al., 2014; Perucho et al., 2015). Na análise do glutamato, o padrão e as amostras foram derivatizados antes da coluna com solução reagente de 2-O-ftialaldeído (OPA). O reagente de derivatização é: 32 mg de OPA diluído em 800 µl de metanol, 7.140 µl de tampão borato 0,4 M (pH 9,5) e 60 µl de ácido 3-mercaptopropiônico (Sigma-Aldrich), preparado a cada semana e protegido da exposição à luz. A reação de derivatização foi realizada com um injetor automático programável. Foram adicionados 10 mL de reagente OPA a 20 µl de padrão ou amostra. Após 1 min de reação, para interrompê-lo, foram adicionados 5 µl de ácido acético a 5%. 32 µl da mistura de reação foram injetados no sistema analítico. Para evitar a injeção de bolhas, foram utilizados 12 µl da mistura como volume de descarga e 20 µl para preencher completamente o circuito calibrado, permanecendo 3 µl no tubo de mistura. A precisão do método de injeção foi medida como um coeficiente de variação da área para dez injeções, resultando em um CV <0,5%. As amostras foram armazenadas a -80°C até a análise. Após homogeneização em 400 µL de ácido perclórico 0,2 M contendo cisteína 3 mM, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para análise por HPLC seguida de detecção fluorimétrica. O sistema compreende uma coluna de cromatografia Ascentis® C18 (250 mm × 2,1 mm, 5 µm; Supelco®, cidade do Texas, EUA), uma bomba LC-20AT acoplada a um amostrador automático SIL-20AHT e um detector de fluorescência RF-20A e LC Software de solução (Shimadzu, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna ficou a 35°C e foi utilizada uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min. A fase móvel consiste em tampão acetato (pH 3,5, ácido acético 12 mM, EDTA 0,26 mM) e metanol (86:14, v/v). A fluorescência é monitorada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 279 e 320 nm, respectivamente. Os picos foram identificados comparando seu tempo de retenção na solução da amostra (extrato de tecido) com o da solução padrão. As amostras tinham um volume de injeção de 20 µL. Os resultados foram expressos em ng/mg de proteína.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto a normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. A partir do momento que a

normalidade foi verificada, foi realizado testes paramétricos. Para as análises bioquímicas e comportamentais os dados foram apresentados como média  $\pm$  DP e analisados por ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 21.0.

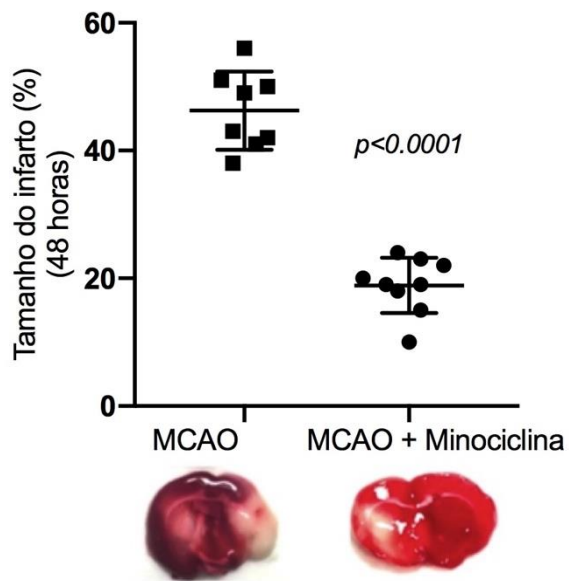
#### 4. RESULTADOS

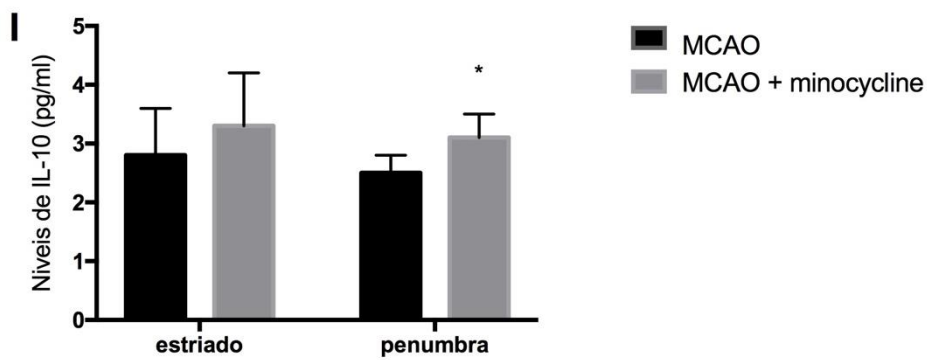
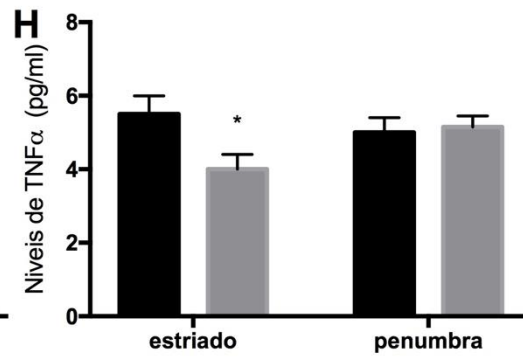
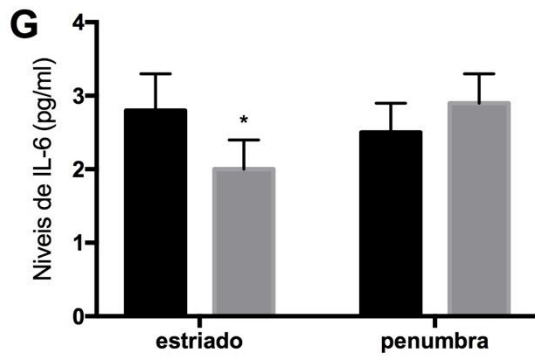
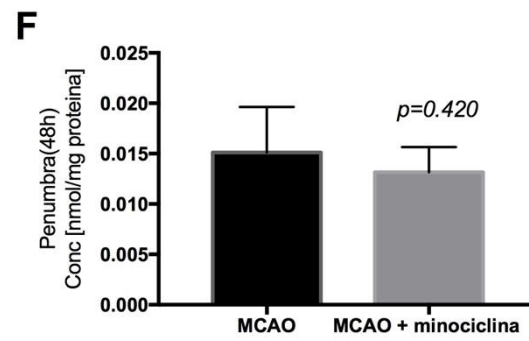
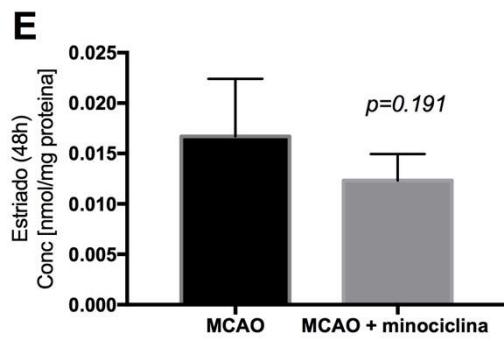
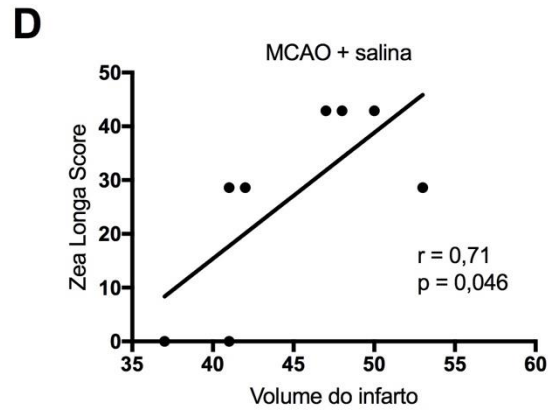
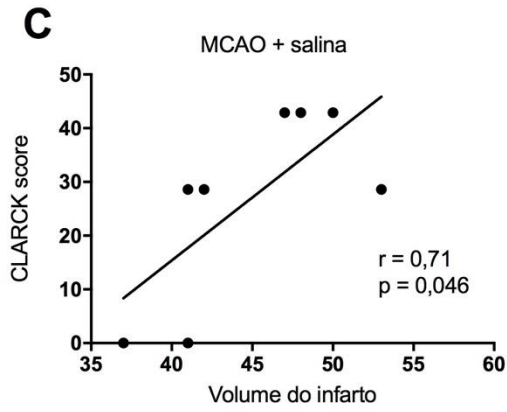
Primeiro, foi determinado o efeito da minociclina na gravidade aguda do AVC (48 horas após MCAO). Foram realizados dois escores de função neurológica (escore de Zea-longa e Clarck). Ocorreu um aumento significativo da frequência no grupo MCAO em comparação com o grupo minociclina ( $p < 0,05$ ) Fig 1 (A). Adicionalmente, a administração de minociclina i.p. proporcionou proteção significativa na redução do volume de infarto Fig 1 (B). Correlações positivas ( $p < 0,05$ ) foram observadas entre o volume de infarto e o escore de Clarck Fig 1 (C) e Zea-longa Fig 1 (D), O tamanho do volume do infarto está relacionado ao agravamento da função neurológica, este resultado demonstra que houve coerência entre a diminuição do volume do infarto e os melhores escores neurológicos. A minociclina não reduziu as concentrações de glutamato em 48 horas Fig 1 (E, F). Finalmente, o tratamento com minociclina reduziu significativamente os níveis de IL-6 no estriado Fig 1 (G) e ocorreu um padrão semelhante nos níveis de TNF- $\alpha$ , que também diminuíram Fig 1 (H). O tratamento com minociclina exhibe propriedades anti-inflamatórias aumentando os níveis de IL-10 na área da penumbra após a indução da tMCAO (I).

A

Scores	MCAO		Minociclina		sig
	n	%	n	%	
<b>Clark</b>					
0 (sem déficit)	-	-	2	28,6	0,006
1 (Retrai a pata dianteira esquerda)	-	-	1	42,9	
2 (Círculos para esquerda)	2	28,6	4	28,6	
3 (Cai enquanto caminha)	3	42,9	-	-	
4(Não anda espontaneamente)	2	28,6	-	-	
Total	7	100	7	100	
<b>Zea Longa</b>					
0 (sem déficit)	-	-	2	28,6	0,012
1 (Falha em estender a pata dianteira esquerda)	-	-	1	14,3	
2 (Circulando para a esquerda)	2	28,6	3	42,9	
3 (Caindo para a esquerda)	3	42,9	1	14,3	
4 (Não caminha)	2	28,6	-	-	
Total	7	100	7	100	

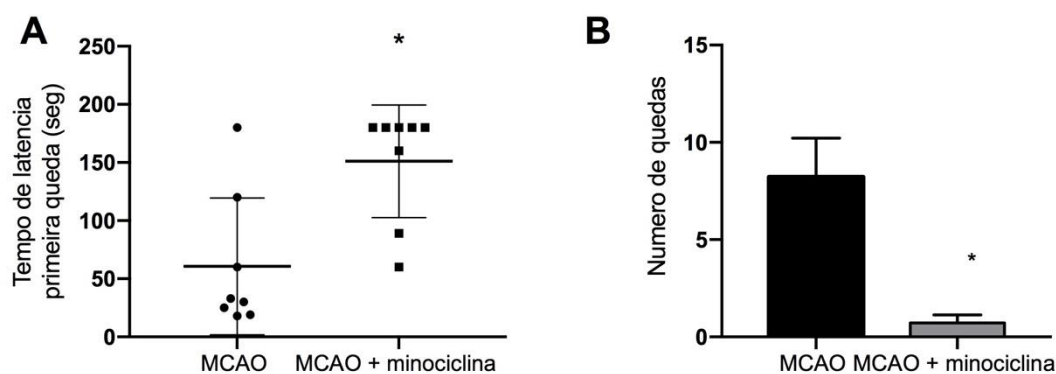
B

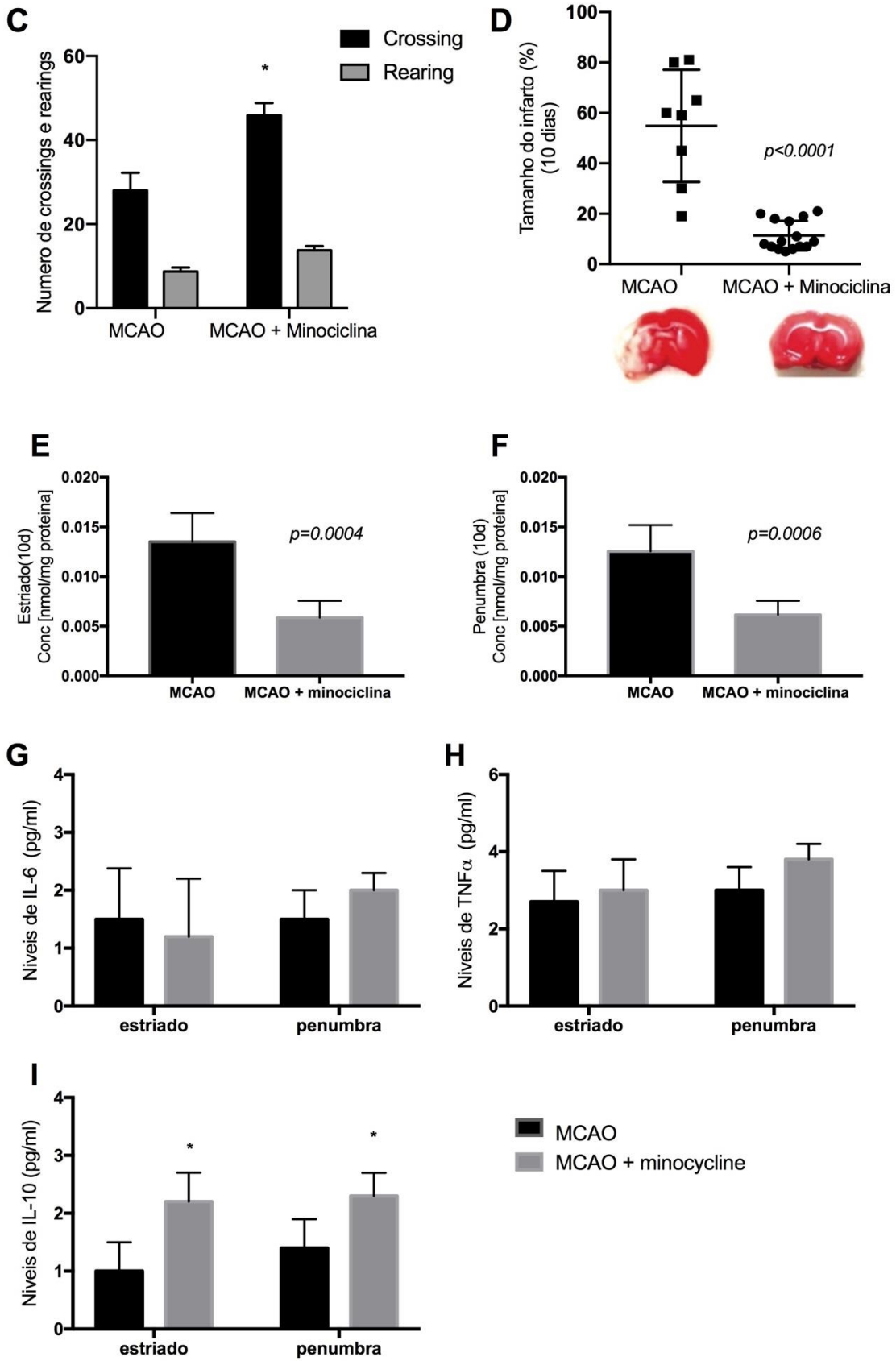




**Figura 1:** A gravidade aguda do AVC foi avaliada 48 horas pós-MCAO. Escores neurológicos gerais foram realizados (A); tamanho do infarto cerebral (B); correlações positivas entre o tamanho do infarto e o escore de Clarck (C) e o escore de Zea Longa (D); Concentrações de glutamato no estriado (E) e na área da penumbra (F); Os níveis de IL-6 na região do estriado e da penumbra são mostrados em (G); TNF (H) e IL-10 (I). n=7-15 por grupo. Os valores de p e r são mostrados nos gráficos. \* p <0,05 vs MCAO.

Os efeitos da minociclina na recuperação motora foram avaliados 10 dias pós-MCAO usando ensaios de atividade locomotora. A latência para a primeira queda foi significativamente melhorada pelo tratamento com minociclina aos 10 dias (p <0,05) Fig 2 (A), bem como o número total de quedas Fig 2 (B). Aos 10 dias, a atividade locomotora espontânea usando a tarefa de campo aberto revelou que os animais tratados com minociclina aumentaram o número de eventos de cruzamento de linha em comparação com animais tratados com salina Fig 2 (C). Todos esses estudos sugerem que a minociclina melhorou a atividade locomotora após MCAO. Além disso, a administração de minociclina i.p. forneceu proteção significativa na redução do volume de infarto até 10 dias após o MCAO Fig 2 (D). Redução significativa na concentração de glutamato é exibida no grupo minociclina no estriado Fig 2 (E) e na área da penumbra Fig 2 (F). Não há diferença nos níveis de citocinas pró-inflamatórias Fig 2 (G, H); por outro lado, o tratamento com minociclina exibe propriedades anti-inflamatórias ao aumentar os níveis de IL-10 na região do estriado e da penumbra após a indução de tMCAO (I).





**Figura 2:** A recuperação motora foi avaliada 10 dias pós-MCAO; O desempenho motor avaliado pela tarefa *Rotarod* é mostrado em A e B; Os cruzamentos de linha e as contagens de criação usando o teste de campo aberto são mostrados em C; tamanho do infarto cerebral (D); Concentrações de glutamato no estriado (E) e na área da penumbra (F); Os níveis de IL-6 na região do estriado e da penumbra são mostrados em (G); TNF (H) e IL-10 (I). n = 7-9 por grupo. \* p<0,05 vs MCAO.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelaram que a minociclina pode ser usada para melhorar os resultados neurológicos e recuperar os danos neuronais e motores causados pela isquemia cerebral possivelmente através de suas propriedades anti-inflamatórias em um modelo animal. Além disso, a minociclina reduz o volume do infarto e diminui a toxicidade do glutamato através de seus efeitos protetores contra lesões neuronais causadas por isquemia cerebral.

Além disso, observa-se uma correlação positiva entre o volume do infarto e a piora da função neurológica. Estudos anteriores relataram uma correlação positiva entre o volume de infarto e a gravidade dos sintomas do AVC (Menezes et al., 2007; Payabvash et al., 2017). Além do volume, a localização de um infarto está fundamentalmente ligada a déficits neurológicos (Payabvash et al., 2017). O modelo de indução MCAO lesiona regiões do cérebro que são irrigadas pela artéria cerebral média, onde origina numerosos ramos superficiais que se distribuem por toda a superfície do hemisfério cerebral, afetando a face súpero lateral do hemisfério.

No processo fisiopatológico do AVC isquêmico agudo, o quadro de hipóxia leva a consequências celulares e moleculares que afetam a estrutura vascular além da função neuronal e glial iniciando uma resposta inflamatória com a produção de radicais livres, proteases, ruptura da barreira hematoencefálica e danos a mielina (Campbell et al., 2019; Jalal et al., 2015). Resultados de ensaios clínicos mostraram que a minociclina oral e intravenosa, aplicada em tempo e dosagens específicas é capaz de melhoras clínicas significativas, evidenciando segurança, eficácia e viabilidade do tratamento (Venkat et al., 2018).

A minociclina é um forte inibidor da ativação microglial (Naderi et al., 2017a, b). Embora os resultados que comprovam a inibição da ativação microglial pela minociclina não tenha sido realizado neste estudo, muitos autores já relataram o efeito da minociclina nesse aspecto (Naderi et al., 2017a, b; Defaux et al., 2011; Cai et al. 2006). Essa inibição ajuda a atenuar a neuroinflamação e pode ser benéfica na prevenção de



deficiências cognitivas e comportamentais (Bortolasci et al., 2020). A minociclina emergiu como um agente terapêutico promissor para o tratamento de AVC no processo de recuperação neurológica. Em modelos animais de isquemia cerebral, foi demonstrado ser neuroprotetor (Yrjanheikki et al., 1998) e reduzir o tamanho do infarto cerebral (Xu et al., 2004; Yrjanheikki et al., 1999). Estudos mostram que a inibição da ativação microglial com minociclina diminui a área do infarto tanto no córtex quanto no estriado após a oclusão da artéria cerebral média (modelo MCAO) (Yrjanheikki et al., 1999; Franco et al., 2012; Cardoso et al., 2013).

Inicialmente a minociclina era conhecida apenas por seus efeitos anti-inflamatórios em distúrbios do SNC, mais tarde, foi postulada como tendo vários efeitos, incluindo efeitos antiapoptóticos e neuroprotetores (Fagan et al., 2011). Esses efeitos neuroprotetores envolvem a modulação da inflamação excessiva (Lalancette-Hebert et al., 2007), a liberação de fatores de crescimento (Thored et al., 2009), o aumento na neurogênese e redução da resposta pró-inflamatória (Ekdahl et al., 2003, Rasmussen et al., 2011, Das et al., 2011). Além disso, outra propriedade da minociclina são os efeitos antioxidantes e a eliminação de radicais livres de oxigênio devido a presença de anel fenólico em sua estrutura (Dai et al., 2017). A literatura relata que minociclina pode proteger o SNC contra estresse oxidativo (Morimoto et al., 2005; Pi et al., 2004; Zhu et al., 2002). Os efeitos anti-inflamatórios da minociclina são mediados pela prevenção da ativação microglial (Wu et al., 2002), reduzindo a toxicidade do glutamato (Tikka et al., 2001) e inibindo a expressão da óxido nítrico sintase (Zhu et al., 2002).

No AVC, as primeiras células imunes a responder são microglia, seguidas por neutrófilos que exacerbam o estresse oxidativo e os danos a barreira hematoencefálica (Kolaczowska et al., 2013; Justicia et al., 2003). As células da glia, depois de ativadas, liberam mediadores que atraem ainda mais neutrófilos, monócitos e linfócitos (Pocock et al., 2007) caracterizando uma resposta inflamatória. A minociclina diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  (Yang et al., 2015; Naderi et al., 2017a, b) e aumenta os níveis de IL-10, além de sua capacidade de promover neurogênese (Dean et al., 2012). Alguns estudos também demonstraram que a minociclina aumenta a neurogênese e acelera a recuperação após isquemia cerebral (Liu et al., 2007; Kim et al., 2009; Tao et al., 2013; Zhao et al., 2015). O efeito inibitório da minociclina na ativação microglial é acompanhado por uma promoção da remielinização e um aumento da sobrevivência dos oligodendrócitos (Defaux et al., 2011). Cai et al. (2006) relataram que a

minociclina aumenta a sobrevivência de oligodendrócitos e promove a viabilidade neuronal e a remielinização após isquemia cerebral em ratos.

Yew et al., (2019) propuseram a via (intraperitoneal) e dosagem de minociclina (primeiros 90mg / kg - após 50mg / kg) e concluíram que, nessas condições, melhoravam a taxa de recuperação da função motora, o que corrobora os resultados aqui apresentados. Além disso, mostramos que a minociclina, nessa via e dosagem, diminui o tamanho do infarto, a toxicidade glutamatérgica e aumenta os níveis de IL10 no cérebro de animais submetidos a MCAO. Postula-se que os efeitos anti-inflamatórios da minociclina possuem papel importante na melhoria da disfunção neurológica em modelo animal de AVC isquêmico.

## **6. CONCLUSÃO**

Conclui-se, então, que a minociclina intraperitoneal apresenta efeito significativo e com desfecho positivo como terapia adjuvante em AVC isquêmico em um modelo experimental em ratos machos *Wistar*, sendo útil estudos posteriores em organismos mais complexos.

## REFERÊNCIAS

- Andersen KK, Olsen TS, Dehlendorff C, Kammergaard LP. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke*. 2009; 40(6): 2068-72.
- Benowitz LI, Carmichael ST. Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke. *Neurobiol Dis*. 2010; 37: 259–66.
- Bensenor IM, Goulart AC, Szwarzwald CL, et al. Prevalence of stroke and associated disability in Brazil: National Health Survey - 2013. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2015; 73(9): 746-50.
- Brait VH, Arumugam TV, Drummond GR, Sobey CG. Importance of T lymphocytes in brain injury, immunodeficiency, and recovery after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012; 32(4):598–611.
- Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009; 40(5): e331-9.
- Brown AW, Schultz BA. Recovery and rehabilitation after stroke. *Semin Neurol*. 2010; 30(5): 511-7.
- Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014; 81:229–48.
- Bye N, Habgood M, Callaway J, et al. Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration. *Exp Neurol*. 2007; 204:220–33.
- Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR et al. AVC isquêmico. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5:70.
- Cardoso MM, Franco EC, de Souza CC, da Silva MC, Gouveia A, Gomes-Leal W. Minocycline treatment and bone marrow mononuclear cell transplantation after endothelin-1 induced striatal ischemia. *Inflammation*. 2013; 36(1): 197–205.
- Chen Z, Venkat P, Seyfried D, et al. Brain-heart interaction: cardiac complications after stroke. *Circ Res*. 2017; 121(4): 451–68.
- Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, Mody I, Carmichael ST. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature*. 2010; 468(7321): 305-9.

Das S, Dutta K, Kumawat KL, Ghoshal A, Adhya D, Basu A. Abrogated inflammatory response promotes neurogenesis in a murine model of Japanese encephalitis. *PLoS One*. 2011; 6: e17225

De Benedetto GE, Fico D, Pennetta A, Malitesta C, Nicolardi G, Lofrumento DD, De Nuccio F, La Pesa V. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014; 98: 266–70.

Del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, Adams HP Jr. American Heart Association Stroke Council. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2009; 40(8): 2945-8.

Easton AS. Neutrophils and stroke—can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? *International Immunopharmacology*. 2013; 17(4): 1218–25.

Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:13632-7.

Feigin VL, Nguyen G, Cercy K, et al. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016. *N Engl J Med*. 2018; 379: 2429–37.

Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol*. 2013; 169:337–52.

Gomes-Leal W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain and Behavior: A Cognitive Neuroscience Perspective*. 2012; 2(3):345–56.

Guimaraes JS, Freire MA, Lima RR, et al. Minocycline treatment reduces white matter damage after excitotoxic striatal injury. *Brain Research*. 2010; 1329(6):182–93.

Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, et al. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Stroke*. 2008; 39(3): 951–8.

Heo K, Cho YJ, Cho KJ, et al. Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. *Neurosc Lett*. 2006; 398(3): 195–200.

Hermann DM, Chopp M. Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation. *Lancet Neurol.* 2012; 11: 369–380.

HISTORY OF STROKE. The Methodist Hospital. Disponível em <[www.methodisthealth.com](http://www.methodisthealth.com)>. Acesso em 01/03/2020.

Ishikawa M, Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation. *Front Biosci.* 2004; 9:1339-47.

Jalal FY, Yang Y, Thompson JF, Roitbak T, Rosenberg GA. Hypoxia-induced neuroinflammatory white-matter injury reduced by minocycline in SHR/SP. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(7): 1145-1153.

Jin R, Zhu X, Li G. Embolic Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) for Ischemic Stroke with Homologous Blood Clots in Rats. *J Vis Exp.* 2014; 17(91): 51956.

Justicia C, Panés J, Solé S, et al. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase 9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003; 23:1430–40.

Kheirbek MA, Britt JP, Beeler JA, Ishikawa Y, McGehee DS, Zhuang X. Adenylyl cyclase type 5 contributes to corticostriatal plasticity and striatum-dependent learning. *J Neurosci.* 2009; 29(39): 12115-24.

Kim MS, Bang JH, Lee J, Han JS, Kang HW, Jeon WK. Fructus mume Ethanol Extract Prevents Inflammation and Normalizes the Septohippocampal Cholinergic System in a Rat Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion. *J Med Food.* 2016; 19: 196-204.

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13:159–75.

Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci.* 2007; 27(10): 2596–605.

Lambertsen KL, Biber K, Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cerebr Blood F Met.* 2012; 32(9): 1677–98

Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nature Medicine.* 2009; 15(2):192–9.

Liu ZW, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol.* 2016; 144:103–20.

- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20: 84-91
- Lotufo PA. Stroke in Brazil: a neglected disease. *São Paulo Med J*. 2005;123(1):3-4.
- Ma YY, Wang JX, Wang YT, Yang GY. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*. 2017; 157:247–72.
- Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, et al. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. *BMC Neuroscience*. 2009; 10(1):126.
- Mizuma A, Yenari MA. Anti-Inflammatory Targets for the Treatment of Reperfusion Injury in Stroke. *Front Neurol*. 2017; 8.
- Morimoto N, Shimazawa M, Yamashima T, Nagabi H, Hara H. Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *Brain Res*. 2005; 1044: 8–15.
- Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Compar Neurol*. 1993; 327(1): 123–32.
- Morrison HW, Filosa JA. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation*. 2013; 10:4.
- Murata Y, Rosell A, Scannevin RH, et al. Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke. *Stroke*. 2008; 39: 3372–77.
- Nagahiro S, Uno M, Sato K, Goto S, Morioka M, Ushio Y. Pathophysiology and treatment of cerebral ischemia. *J Med Invest*. 1998; 45(1-4): 57-70.
- Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, et al. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *The FASEB Journal*. 2006; 20(6):714–6.
- Neumann J, Sauerzweig S, Röncke R, et al. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *The J. Neurosci*. 2008; 28(23): 5965–75.
- Pekna M, Pekny M, Nilsson M. Modulation of neural plasticity as a basis for stroke rehabilitation. *Stroke*. 2012; 43: 2819–28.
- Perucho J, Gonzalo-Gobernado R, Bazan E, et al. Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC. *Amino Acids*. 2015; 47: 963-73.

Pi R, Li W, Lee NT, et al. Minocycline prevents glutamate-induced apoptosis of cerebellar granule neurons by differential regulation of p38 and akt pathways. *J Neurochem.* 2004; 91:1219–1230.

Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 2007; 30:527–35.

Rasmussen SJ, Imitola A, Ayuso-Sacido Y, et al. Reversible neural stem cell niche dysfunction in a model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011; 69: 878-91.

Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *J Vis Exp.* 2012; 6(69): pii: 4038.

Sheikh AM, Malik M, Wen G, et al. BDNF-Akt-Bcl2 antiapoptotic signaling pathway is compromised in the brain of autistic subjects. *J Neurosci Res.* 2010; 88(12): 2641–2647.

Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cel Neurosc.* 2013; 7(30): 6.

Sims NR, Yew WP. Reactive astrogliosis in stroke: contributions of astrocytes to recovery of neurological function. *Neurochem Int.* 2017; 107:88–103.

Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16: 249–63.

Sohlberg MM, Mateer CA. *Reabilitação cognitiva: Uma abordagem neuropsicológica.* 2009; São Paulo, SP: Santos.

Sonmez E, Kabatas S, Ozen O, et al. Minocycline treatment inhibits lipid peroxidation, preserves spinal cord ultrastructure, and improves functional outcome after traumatic spinal cord injury in the rat. *Spine* 2013; 38:1253–9.

Souza-Rodrigues RD, Costa AM, Lima RR, et al. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. *Brain Research.* 2008; 1200(20): 78–88.

Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, et al. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2004; 24(9): 2182–90.

Thored P, Heldmann U, Gomes-Leal W, et al. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia.* 2009; 57(8): 835–49.

Tóth M, Little P, Arnberg F, et al. Acute neuroinflammation in a clinically relevant focal cortical ischemic stroke model in rat: longitudinal positron emission tomography and immunofluorescent tracking. *Brain Stru Func.* 2016; 221(3):1279–90.

Uluc KA, Miranpuri A, Kujoth GC, Aktüre E, Başkaya MK. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Vis Exp.* 2011; 5(48): pii: 1978.

Vasconcelos DP, Rodrigues KST, Freitas CASL, Sousa SMM. Assistência de Enfermagem a Pacientes Portadores de Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico, Embasado na Teoria de Paterson-Zderad, Trabalho apresentado no 7ºCBCENF - Congresso Brasileiro dos Conselhos de Enfermagem Fortaleza. 2004.

Venkat, P Shen Y, Chopp M, Chen J. Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke. *Neuropharmacol.* 2018;134: 310-322.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000; 7: 333-40.

Wen Y, Zhang X, Dong L, Zhao J, Zhang C, Zhu C. Acetylbritannilactone modulates microRNA-155-mediated inflammatory response in ischemic cerebral tissues. *Mol Med.* 2015; 21:197–209.

Xu L, Fagan SC, Waller JL, et al. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurol.* 2004; 4: 7.

Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics.* 2010; 7: 378–91.

Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurology.* 2004; 3(12): 744–51.

Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:15769–74.

Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemic with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:13496–500.



Yune TY, Lee JY, Jung GY, et al. Minocycline alleviates death of oligodendrocytes by inhibiting pro-nerve growth factor production in microglia after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2007; 27(29): 7751–61.

Zeng X, Deng A, Ding Y. The INTERSTROKE study on risk factors for stroke. *The Lancet*. 2017; 389(10064): 35.

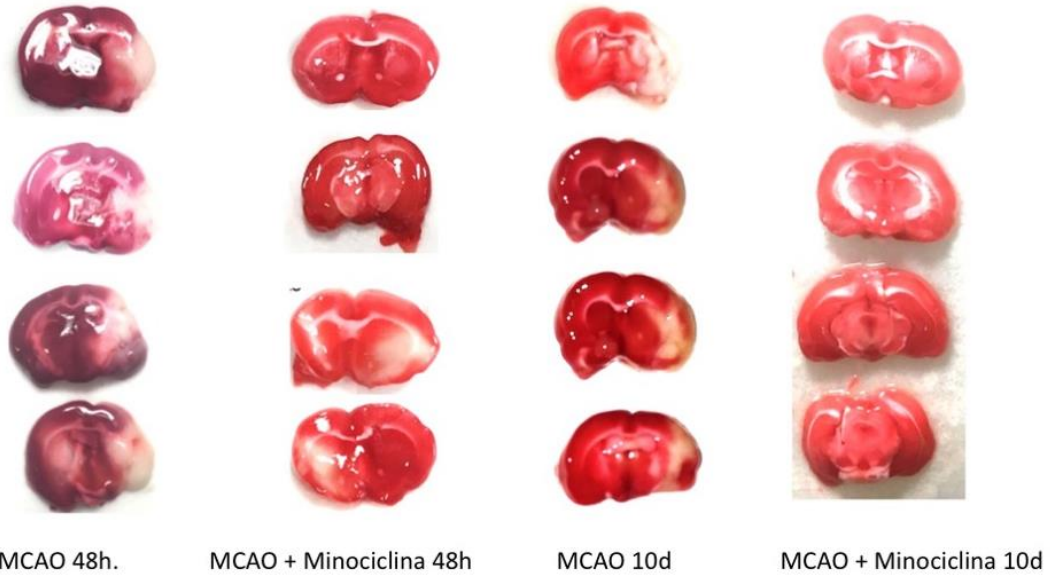
Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010; 464:104-107.

Zhou W, Liesz A, Bauer H, et al. Postischemic brain infiltration of leukocyte subpopulations differs among murine permanent and transient focal cerebral ischemia models. *Brain Pathol*. 2013; 23: 34–44.

Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature Medicine*. 2002; 417: 74–8.

## APÊNDICE

**APENDICE I** - Material Complementar - Imagens representativas utilizadas na estatística da Figura 1.



**Material Complementar 1:** fatias cerebrais representativas são mostradas para cada grupo. A área branca representa a área da penumbra, que o TTC não corou. Diferentes animais são mostrados.

## ANEXO I – Parecer do comitê de ética



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **11/06/2019**.

Título do projeto	Efeito do cloridrato de minociclina em modelo animal de AVC isquêmico
Project title	Effect of minocycline hydrochloride on animal model of ischemic stroke
Número do protocolo Protocol number	029/2019-1 adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	<b>Felipe Dal-Pizzol</b>
Pesquisadores Researchers	Mariane Abatti, Monique Michels, Andriele da Silva Vieira, Heloisa Borges, Filipe Fernandes Gabriel, Amanda Goulart Indalécio, Caroline Serafim Dagostin, Juliano dos Santos Cardoso.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2019 a 30/05/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	2 meses/200-300g
Número de animais / Gênero	100 / Masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

  
Samira da Silva Valvassori  
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 11 de junho de 2019.