

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

HELOÍSA DE MEDEIROS BORGES

**AÇÃO NEUROPROTETORA DA MINOCICLINA EM DIFERENTES
MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO
CEREBRAL**

CRICIÚMA

2022

HELOÍSA DE MEDEIROS BORGES

**AÇÃO NEUROPROTETORA DA MINOCICLINA EM DIFERENTES
MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO
CEREBRAL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para exame de qualificação em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pacheco
Rico

Co-orientadora: Dr^aMonique Michels

CRICIÚMA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B732a Borges, Heloísa de Medeiros.

Ação neuroprotetora da minociclina em diferentes modelos experimentais de lesão de isquemia e reperfusão cerebral / Heloísa de Medeiros Borges. - 2022.

77 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Orientação: Eduardo Pacheco Rico.

Coorientação: Monique Michels.

1. Minociclina - Uso terapêutico. 2. Minociclina - Efeito fisiológico. 3. Hipóxia encefálica - Tratamento. 4. Traumatismo por reperfusão - Tratamento. 5. Microglia. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
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 391

Com início às 15h (quinze horas) do dia doze de abril de 2022 (dois mil e vinte e dois), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **HELOÍSA DE MEDEIROS BORGES**, sob a orientação do **Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO**, intitulada “**AÇÃO NEUROPROTETORA DA MINOCICLINA EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Carla Inês Tasca (Universidade 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 16h30 (quinze horas e trinta 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, 12 (doze) de abril de 2022 (dois mil e vinte e dois).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

Dedico este trabalho aos meus orientadores,
Eduardo e Monique, que sempre me
fortaleceram diante as dificuldades
encontradas no caminho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a equipe do Grupo de Pesquisa em Alcoolismo, e do Laboratório de Fisiopatologia Experimental da UNESC, por toda ajuda e companherismo durante a realização do meu mestrado. Vocês foram essenciais em minha jornada, e certamente tornaram tudo mais leve e alegre. Agradeço também à Universidade do Extremo Sul Catarinense, que me fez crescer desde minha graduação, bem como durante todo o mestrado.

Aos meus orientadores, Eduardo e Monique, devo gratidão eterna. Vocês são pesquisadores que inspiram! Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, e principalmente por guiarem este projeto comigo, sempre me fortalecendo e orientando perante os desafios dessa jornada. Agradeço em especial a doutoranda Emily, que se tornou uma grande aliada na realização desse projeto.

Agradeço também minha família e amigos, principalmente minha mãe, meu pai, meu irmão Otávio, meu namorado Léo e minha prima/amiga/companheira Duda. Sem vocês, eu não teria chegado tão longe. Obrigada por sempre acreditarem em mim, apoiarem meus estudos, e principalmente por serem minha base nesses últimos 2 anos. Essa conquista também é de vocês!

Também gostaria de deixar registrado o meu agradecimento ao órgão de fomento CAPES, por ter me beneficiado com a bolsa e pela colaboração durante a realização deste projeto.

E por fim, gratidão a Deus, por ter vivido uma experiência de crescimento profissional e pessoal como esta. Que ele continue me guiando nos novos desafios que estão por vir.

RESUMO

Lesões de hipóxia cerebral, tanto global quanto focal apresentam fisiopatologia de lesão de isquemia e reperfusão tecidual, caracterizada pela excitotoxicidade, ativação microglial e neuroinflamação. Estudos envolvendo a minociclina revelam um efeito secundário neuroprotetor importante, agindo sobre mecanismos inflamatórios, entre eles o bloqueio da ativação microglial, por isto, é visada como fármaco potencial em tratamento de lesões de isquemia e reperfusão (I/R). Estudos com modelos alternativos de lesão de hipóxia cerebral podem apresentar contribuições importantes para o entendimento da patologia, além de novos dados e confirmações de resultados presentes na literatura. Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar a ação da minociclina em diferentes modelos experimentais de lesão de I/R cerebral. Para tal, foi utilizado modelo *in vitro* com células microgliais de linhagem Bv-2, e modelo *in vivo* em peixe-zebra. Ambas as metodologias passaram por padronização de protocolo de hipóxia. Nos dois modelos utilizou-se os seguintes grupos: Controle; Controle + Minociclina; Hipóxia e Hipóxia + Minociclina. *In vitro*, em sequência ao protocolo de privação de oxigênio e glicose (POG), os grupos tratados receberam 50 µM de minociclina por 24h. Após as 24h as amostras foram retiradas para as análises neuroquímicas. Em peixe-zebra, foi realizada a indução da hipóxia seguido da administração de minociclina a 1mg/L por 1h. Após esse período foram realizados os experimentos comportamentais e neuroquímicos. *In vitro* pela técnica de MTT observou-se que a minociclina é capaz de reverter a redução de viabilidade celular induzida pela hipóxia, também foi capaz de diminuir a ativação de micróglia após POG, aumentando níveis de IL-10. Além disso, foi possível observar que a minociclina foi capaz de reverter o aumento dos índices de DCFH. O protocolo POG em Bv-2 padronizado no presente estudo reproduziu dados característicos da fisiopatologia de lesão I/R pós hipóxia em parâmetros de estresse oxidativo, níveis de glutamato e citocinas pró-inflamatórias. Em modelo *in vivo* pela técnica de TTC observou-se que a minociclina reverteu a redução da viabilidade celular induzida pela hipóxia, além de reverter a área de lesão isquêmica. A minociclina também se mostrou capaz de auxiliar na recuperação comportamental de parâmetros motores após hipóxia. O protocolo de hipóxia em peixe-zebra padronizado no presente estudo reproduziu dados característicos da fisiopatologia de lesão I/R em parâmetros de estresse oxidativo e níveis de glutamato. Com estes resultados conclui-se que modelos de cultura de células e de peixe-zebra são alternativas vantajosas, capazes de reproduzir a literatura e propor novas importantes perspectivas para pesquisas. E que a minociclina em dose única foi capaz de reverter os danos causados sobre a viabilidade celular em ambos os modelos. Além de reduzir a ativação microglial *in vitro*, e melhorar parâmetros comportamentais *in vivo*.

Palavras chave: Hipóxia, minociclina, peixe-zebra, micróglia.

ABSTRACT

Global and focal Cerebral hypoxia lesions, present pathophysiology of tissue ischemia and reperfusion injury, characterized by excitotoxicity, microglial activation and neuroinflammation. Studies related minocycline reveal an important neuroprotective secondary effect, acting on inflammatory mechanisms, including the blockade of microglial activation. Therefore, this targeted as a potential drug in the treatment of I/R lesions. Studies using alternative models of brain hypoxia injury may present important contributions to the understanding this pathology. Thus, the aim of this study was evaluate the effect of minocycline in different experimental models of brain I/R injury. For this, the *in vitro* model through microglial Bv-2 lineage cells, and *in vivo* model in zebrafish was used. Both methodologies underwent hypoxia protocol standardization. For both models, the following groups were applied: Control; Control + Minocycline; Hypoxia and Hypoxia + Minocycline. *In vitro*, following the POG protocol, the treated groups received 50 μ M of minocycline for 24h, after 24h samples were taken for analysis. In zebrafish, hypoxia was induced followed by the administration of minocycline at 1mg/L for 1h. After this period, behavioral and neurochemical experiments were carried out. *In vitro* by the MTT technique it was observed that minocycline is able to reverse the reduction of cell viability induced by hypoxia, it was also able to decrease the activation of microglia after POG, increasing levels of IL-10. In addition, it was possible to observe that minocycline was able to reverse the increase of DCFH levels. The POG protocol in Bv-2 standardized in the present study reproduced characteristic data of the pathophysiology of post-hypoxia I/R injury in parameters of oxidative stress, glutamate levels and pro-inflammatory cytokines. The *in vivo* model using the TTC technique, it was observed that minocycline reversed the reduction in cell viability induced by hypoxia, and also to reversing the area of ischemic injury. Minocycline was also able to help in the behavioral recovery of motor parameters after hypoxia. The zebrafish hypoxia protocol standardized in the present study reproduced characteristic data on the pathophysiology of I/R injury on oxidative stress parameters and glutamate levels. These results pormits to conclude that alternative models of cell culture and zebrafish are advantageous alternatives, able to reproduce the literature data and proposing important new perspectives for research. And that single-dose minocycline was able to reverse the damage caused under cell viability in both models. In addition to reducing microglial activation *in vitro*, and improving behavioral parameters *in vivo*.

Keywords: Hypoxia, minocycline, zebrafish, microglia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismos contribuintes para a lesão de I/R.....	16
Figura 2: Ativação microglial frente ao AVC.....	20
Figura 3: Desenho experimental da primeira etapa: experimento <i>in vitro</i> com células Bv-2 (micróglia).....	28
Figura 4: Desenho experimental da segunda etapa: experimento <i>in vivo</i> com modelo animal de peixe-zebra.....	32
Figura 5: Efeito <i>in vitro</i> da minociclina sobre a viabilidade celular em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG.....	39
Figura 6: Efeito <i>in vitro</i> da minociclina sobre as características morfológicas de cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG.....	40
Figura 7: Efeito <i>in vitro</i> da minociclina sobre a razão DAP/IBA-1, em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG.....	41
Figura 8: Efeito <i>in vitro</i> da minociclina sobre a ativação microglial com relação aos imunomarcadores DAP/IBA-1 em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG.....	42
Figura 9: Efeito <i>in vitro</i> da minociclina sobre os níveis de glutamato em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG.....	43
Figura 10: Efeito <i>in vitro</i> da minociclina sobre a oxidação de DCFH em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG.....	43
Figura 11: Efeito <i>in vitro</i> da minociclina sobre o conteúdo de sulfidrilas em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG.....	44
Figura 12: Efeito <i>in vitro</i> da minociclina sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG.....	45
Figura 13: Efeito da minociclina <i>in vitro</i> sobre os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-10 em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG.....	46

Figura 14: Efeito <i>in vivo</i> de diferentes concentrações de minociclina sobre a viabilidade celular em peixe-zebra após o protocolo de hipóxia.....	47
Figura 15: Efeito <i>in vivo</i> da minociclina sobre a área isquêmica em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia.....	48
Figura 16: Efeito <i>in vivo</i> da minociclina sobre os níveis de glutamato em cérebro total de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia.....	48
Figura 17: Efeito <i>in vivo</i> da minociclina sobre a oxidação de DCFH em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia.....	49
Figura 18: Efeito <i>in vivo</i> da minociclina sobre os níveis de TBARS em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia.....	50
Figura 19: Efeito <i>in vivo</i> da minociclina sobre o conteúdo de sulfidrilas em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia.....	50
Figura 20: Efeito <i>in vivo</i> da minociclina sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia.....	51
Figura 21: Efeito <i>in vivo</i> da minociclina sobre diferentes parâmetros motores de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia.....	52
Figura 22: Efeito <i>in vivo</i> da minociclina na distância percorrida por peixe-zebra após o protocolo de hipóxia.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC- Acidente vascular cerebral

BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*)

BHE- Barreira hematoencefálica

Ca⁺- Cálcio

CAT- Catalase

DAMPS- Padrões moleculares associados a danos (do inglês, *damage-associated molecular patterns*)

DCF- Fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína

DCF-DA- Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína

DMSO- Dimetilsulfóxido

ERO- Espécies reativas de oxigênio

FDA- *Food and Drug Administration*

GDH- Glutamato desidrogenase (do inglês, *glutamate dehydrogenase*)

I/R- Isquemia e reperfusão

IGF-1- Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (do inglês, *insulin-like growth factor-1*)

IL-1- Interleucina 1

IL-10- Interleucina 10

IL-6- Interleucina 6

MCAO- Oclusão da artéria cerebral média (do inglês, *Middle cerebral artery occlusion*)

MTT- Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

Na⁺ /K⁺ATPase- Bomba de sódio e potássio

NMDA N-metil D-Aspartato

O₂- Oxigênio

pH - Potencial hidrogeniônico

POG- Privação de oxigênio e glicose

SBF- Soro bovino fetal

SNC- Sistema nervoso central

SOD- Superóxido dismutase

TGF- β - Fator de Crescimento transformador- β (do inglês, *transforming growth factor β*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alpha (do inglês, *Human Tumor Necrosis Factor- α*)

tPA- Ativador do plasminogênio tecidual

TTC- 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride

UNESC- Universidade do Extremo Sul Catarinense

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, *vascular endothelial growth factor*)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL- DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	13
1.2	FISIOPATOLOGIA DA LESÃO DE I/R CEREBRAL.....	15
1.2.1	Mecanismos intracelulares da lesão I/R.....	16
1.2.2	Neuroinflamação e o papel da micróglia sobre a I/R cerebral	18
1.3	MODELO <i>IN VITRO</i>	20
1.4	PEIXE-ZEBRA	22
1.5	MINOCICLINA.....	23
1.6	JUSTIFICATIVA	25
2.	OBJETIVOS.....	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	PRIMEIRA ETAPA: EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> EM LINHAGEM BV-2 DE MICRÓGLIAS.....	27
3.1.1	Linhagem BV-2	27
3.1.2	Modelo de protocolo de privação de oxigênio e glicose <i>in vitro</i>..	27
3.1.3	Desenho experimental BV-2.....	28
3.2	SEGUNDA ETAPA: EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> EM MODELO EXPERIMENTAL DE PEIXE-ZEBRA	29
3.2.1	Peixe-zebra	29
3.2.2	Modelo de protocolo de hipóxia em peixe-zebra.....	30
3.2.3	Desenho experimental peixe-zebra	31
3.3	METODOLOGIAS DAS ANÁLISES APLICADAS	32
3.3.1	Viabilidade celular por MTT.....	33
3.3.2	Viabilidade celular por TTC	33
3.3.3	Visualização da área isquêmica por coloração de TTC	33
3.3.4	Ensaio de imunofluorescência	34
3.3.5	Dosagem de proteínas.....	34
3.3.6	Dosagem de citocinas por ELISA	34
3.3.7	Níveis de glutamato por kit de atividade de GDH.....	35
3.3.8	Oxidação por DCFH	35

3.3.9	Conteúdo de sulfidrina	36
3.3.10	Níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) 36	
3.3.11	Atividade da Catalase	37
3.3.12	Atividade da SOD	37
3.4	COMPORTAMENTO MOTOR DE PEIXE-ZEBRA APÓS PROTOCOLO DE HIPÓXIA	37
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4.	RESULTADOS	39
4.1	VIABILIDADE CELULAR EM LINHAGEM BV-2	39
4.2	MORFOLOGIA CELULAR PÓS PROTOCOLO POG	39
4.3	ATIVAÇÃO MICROGLIAL	40
4.4	NÍVEIS DE GLUTAMATO EM BV-2	42
4.5	AVALIAÇÃO DE PARAMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS BV-2	43
4.5.1	Oxidação de DCFH	43
4.5.2	Conteúdo de grupos sulfidrilas	44
4.5.3	Atividade de enzimas antioxidantes	45
4.6	NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS BV-2	45
4.7	TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE MINOCICLINA EM PEIXE-ZEBRA A PARTIR DA VIABILIDADE CELULAR	46
4.7.1	Visualização da área isquêmica por coloração de TTC em peixe-zebra	47
4.8	NÍVEIS DE GLUTAMATO EM PEIXE-ZEBRA	48
4.9	AVALIAÇÃO DE PARAMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXE-ZEBRA	49
4.9.1	Oxidação de DCFH	49
4.9.2	Peroxidação lipídica	49
4.9.3	Conteúdo de grupos sulfidrina	50
4.9.4	Atividade de enzimas antioxidantes	50
4.10	COMPORTAMENTO MOTOR DO PEIXE-ZEBRA	51
4.10.1	Perfil locomotor em peixe-zebra após protocolo de hipóxia	52
5.	DISCUSSÃO	54
6.	CONCLUSÃO	63

7.	REFERÊNCIAS	64
----	-------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL- DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A isquemia pode ser definida como a interrupção parcial ou completa do fluxo sanguíneo em determinado órgão ou tecido. Essa interrupção leva a privação de substâncias essenciais à sobrevivência celular, como a glicose, oxigênio e outros substratos metabólicos (Dirnagl et al., 1999). Logo após o episódio isquêmico surge a reperfusão, que é definida como a fase de retorno do fluxo sanguíneo ao órgão ou tecido acometido pela isquemia. Mesmo que seu surgimento tenha o objetivo de restaurar a homeostase no tecido lesado, o retorno repentino da circulação pode acarretar em uma onda de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e agravar o processo inflamatório local (Eltzschig e Eckle 2011; Mizuma; Yenari, 2017; Wu et al., 2018).

Juntos, estes episódios são nomeados como lesão de isquemia/reperfusão (I/R), e possuem grande potencial de dano ao tecido acometido. Este tipo de lesão está presente em diversas patologias, contribuindo diretamente com os altos índices de mortalidade e de déficits permanentes (Eltzschig e Eckle, 2011; Wu et al., 2018). O infarto agudo do miocárdio é uma das doenças mais características da lesão de I/R. Esta patologia isquêmica do coração foi a principal causa de morte entre os brasileiros em 2019, chegando em cerca de 171 mil casos (Oliveira et al., 2020). Outras patologias que compartilham a fisiopatologia da lesão de I/R são a lesão renal aguda (Hoste et al., 2018), obstrução arterial aguda (Da Silveira e Yoshida, 2019), obstrução intestinal (Ribeiro e Yoshida, 2019), e o acidente vascular cerebral (AVC), foco do presente estudo.

O cérebro pode ser afetado por lesões de I/R em diferentes condições, com a isquemia cerebral global e a isquemia cerebral focal. Devido a sua grande demanda de oxigênio (O₂), e dependência constante para manter as condições normais de funcionamento, pode-se observar em episódios isquêmicos cerebrais, de ambas as condições, uma cascata de eventos causadores de danos (Dirnagl et al., 1999; Campbell et al., 2019). Estes variam conforme a gravidade e intensidade da isquemia, mas geralmente interferem na

funcionalidade cerebral, e são capazes de ocasionar sequelas permanentes (Pesquine et al, 2010; Wu et al., 2018).

A isquemia cerebral focal, ocasionada pelo AVC é a condição de maior incidência entre a população mundial (Feigin et al., 2018). Ocorre devido a interrupção aguda do fluxo sanguíneo arterial, e possui duas classificações, conforme sua fisiopatologia. É nomeado AVC isquêmico quando o vaso é obstruído por um êmbolo ou trombo. Já o AVC hemorrágico é decorrente de uma ruptura da parede da artéria cerebral (Dirnagl et al., 1999; Campbell et al., 2019).

Estes episódios apresentam um núcleo isquêmico, que é definido como o volume de tecido no qual todas as células cerebrais, vasos sanguíneos, e fibras nervosas sofreram a hipóxia, e conseqüentemente a necrose (Dirnagl et al., 1999). Contornando o núcleo isquêmico, há uma área de transição conhecida como penumbra isquêmica, que corresponde a um grupo de células que perderam parcialmente o fluxo sanguíneo (Campbell et al., 2019). Embora esta área esteja metabolicamente ativa, seu funcionamento ocorre de forma reduzida e prejudicada, apresentando-se vulnerável ao ambiente de lesão I/R, podendo acometer mais células com o tempo e/ou também se tornar parte do núcleo isquêmico (Dirnagl et al., 1999; Del Zoppo et al., 2009; Mizuma e Yenari, 2017).

De maneira geral, o AVC afeta anualmente 13,7 milhões de pessoas no mundo, e é considerado a segunda maior causa de mortalidade, com 5,5 milhões mortes por ano (Feigin et al., 2018). Outros dados epidemiológicos trazem estatísticas alarmantes em relação aos sobreviventes do AVC, colocando a patologia como uma das principais causadoras de incapacidade física ou neurológica. Suas conseqüências são diversas, podendo causar déficits neurológicos permanentes, dentre as quais se destacam a hemiplegia, reflexos diminuídos, dormência e problemas de equilíbrio. Estima-se que atualmente exista mais de 80 milhões de sobreviventes do quadro de AVC, gerando um grande problema econômico mundial (Johnson et al., 2019).

A isquemia cerebral global ocorre quando há uma falência circulatória generalizada, sendo secundária a outras causas (Sanganalmath et al., 2017). Como exemplos, pode-se citar casos decorrentes por parada cardíaca, cirurgias de grande porte com bloqueio da circulação sanguínea, e choques hemorrágicos ocasionados por traumas. Mesmo que o acometimento seja global, o cérebro é

sempre o órgão mais atingido, e um dos primeiros a sofrer as consequências da lesão de I/R, devido ao seu alto consumo de energia e atividade elétrica, chegando a 20% do consumo total de oxigênio (Harukuni; Bhardwaj, 2006; T Neumann et al., 2013). Em geral, quanto mais completa a privação, mais grave o dano ao cérebro e maiores as consequências (Pesquine et al., 2010).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO DE I/R CEREBRAL

A fisiopatologia da lesão cerebral isquêmica é complexa, com diferentes mecanismos sendo ativados simultaneamente, como demonstrado na figura 1. A lesão atinge o cérebro de maneira não uniforme, e tem como alvo diferentes tipos celulares (Ceulemans et al., 2010; Wu et al., 2018). Alguns mecanismos ganham destaque na lesão isquêmica, como o aumento intracelular de cálcio e excitotoxicidade; comprometimento mitocondrial, e ativação de vias de morte celular; produção excessiva de ERO e nitrogênio (ERN) e ativação de células imunes, principalmente micróglias, que liberam mediadores inflamatórios (Harukuni; Bhardwaj, 2006; Ceulemans et al., 2010; Campbell et al., 2019).

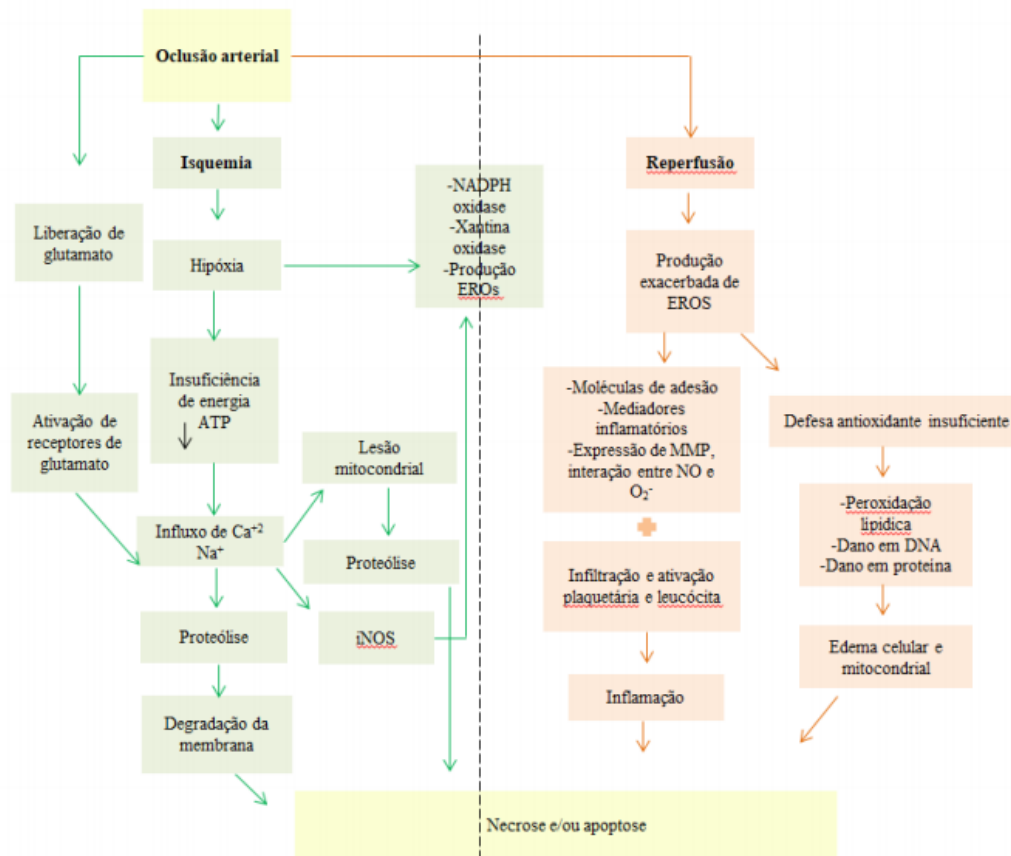


Figura 1: Mecanismos contribuintes para a lesão de I/R. A oclusão arterial ocasiona uma cascata de acontecimentos que fazem parte da lesão de isquemia e reperusão, ambos os acontecimentos danosos da cascata poderão resultar em necrose e/ou apoptose celular. Adaptada de Ceulemans et al, (2010).

1.2.1 Mecanismos intracelulares da lesão I/R

Devido a interrupção do fluxo sanguíneo e conseqüente escassez de oxigênio e glicose, as células cerebrais obrigatoriamente iniciam o sistema anaeróbico. Este tipo de respiração causa dano mitocondrial levando a alteração do potencial hidrogeniônico (pH) intracelular, o tornando mais ácido, que por si só, é capaz de ativar vias de necrose (Campbell et al., 2019). A perda de homeostase celular resulta na falha da bomba de sódio e potássio ($\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$), despolarização celular e aumento das concentrações intracelulares de cálcio (Ca^{2+}) (Ceulemans et al., 2010; Campbell et al., 2019).

O aumento do Ca^{2+} intracelular é um ponto chave para o desencadeamento de vários eventos tais como a ativação de enzimas proteolíticas cálcio dependentes. Entre elas, as fosfolipases que promovem a

degradação de proteínas estruturais de membrana e do citoesqueleto, oxidação lipídica, edema celular e ativação da via de necrose (Szydłowska; Tymianski, 2010). O Ca^{+} também ativa enzimas, como as endonucleases, que levam a quebra do DNA, enzimas pró-oxidantes, como óxido nítrico sintase e resultam na produção de óxido nítrico, de ERO e ERN (Clarkson et al., 2010; Belov Kirdajova., et al 2020).

As respostas decorrentes do aumento de Ca^{+} , associadas a despolarização celular progressiva, e a falha na bomba de $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+}$ ATPase induzem a liberação do neurotransmissor excitatório glutamato (Choi; Rothman, 1990). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso de mamíferos. Em baixas concentrações, desempenha um papel fisiológico importante, controlando muitas ações no encéfalo, como a rápida transmissão sináptica para a comunicação neurônio a neurônio, crescimento neuronal, orientação dos axônios, desenvolvimento e maturação do cérebro e na plasticidade sináptica. Porém em altas concentrações na fenda sináptica, contribui para a fisiopatologia de doenças como o AVC, epilepsia, além de doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer e de Parkinson (Clarkson et al., 2010; Lai et al., 2014).

O acúmulo de glutamato na fenda sináptica é neurotóxico e faz com que ocorra ainda mais entrada de Ca^{+} na célula, principalmente por causar a hiperativação de receptores, como o N-metil D-Aspartato (NMDA). Consequentemente são desencadeados danos e vias de morte celular, que caracterizam o quadro de excitotoxicidade glutamatérgica, considerado um dos principais responsáveis pelo dano neural, e um dos primeiros desencadeadores de necrose e apoptose no núcleo isquêmico (Clarkson et al, 2010; Lai et al., 2014; Campbell et al., 2019; Belov Kirdajova et al., 2020).

Nessa cascata de eventos a mitocôndria desempenha um papel importante no processo de morte celular durante a lesão I/R. Ocorre um prejuízo na funcionalidade da cadeia respiratória, produzindo em excesso de ERO, ocasionando lesão e perda de elétrons, gerando edema celular, estresse e lise celular, resultando em necrose. Adicionalmente ocorre o inchaço na matriz mitocondrial, ocasionando a ruptura ou abertura de canais que liberam o

citocromo C, que ativa caspases iniciando a cascata de sinalização apoptótica (Harukuni. Bhardwaj, 2006; Belov Kirdajova et al., 2014).

1.2.2 Neuroinflamação e o papel da micróglia sobre a I/R cerebral

Após o episódio isquêmico inicial, ainda na primeira hora surge a reperfusão tecidual, com intuito de reestabelecer o aporte de oxigênio e nutrientes da área atingida (Eltzschig e Eckle 2011). Porém este mecanismo acaba contribuindo para a lesão dos tecidos acometidos, em consequência do restabelecimento de oxigênio, que favorece a formação de EROs, migração de células imunes periféricas e diferenciação celular. Em conjunto, estes fatores contribuem para a neuroinflamação e morte celular (Ceulemans et al., 2010; Mizuma e Yenari, 2017; Radak et al., 2017).

Devido aos mecanismos de lesão celular, o ambiente isquêmico se encontra repleto de EROs, padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e mediadores inflamatórios (Kamel e Iadecola, 2012). Consequentemente, a resposta imune também é ativada, com predomínio do perfil pró-inflamatório. Principalmente na fase aguda, a ativação imune pode acontecer de forma descontrolada, causando lesão celular adicional e prejudicando principalmente as células adjacentes ao núcleo isquêmico que não tinham sido afetadas como a região da penumbra (Ceulemans et al., 2010; Campbell et al., 2019).

Especificamente, as células residentes do sistema nervoso central (SNC), micróglia e astrócitos, são primeiramente ativadas em consequência da hipóxia, posteriormente, as células imunes periféricas também chegam no local da lesão após as primeiras horas do evento isquêmico (Kamel e Iadecola, 2012). No episódio de lesão por I/R a micróglia é a principal célula responsável por coordenar a resposta imune, e regular o dano neuronal. Tais funcionalidades estão associadas ao seu desempenho no início da cascata inflamatória e por possuir a característica de ser modulada de diferentes formas conforme o estímulo, assumindo fenótipos benéficos, mas também prejudiciais durante o episódio isquêmico (Morrison e Filosa, 2013; Belov et al., 2020).

De forma geral, no cérebro saudável, as micróglias apresentam morfologia ramificada característica, e geralmente são descritas em um estado

de “repouso” ou M0, embora estejam constantemente trabalhando para manter a homeostase sináptica e neuronal do SNC (Färber e Kettenmann, 2005). Quando ativada, a micróglia apresenta uma morfologia amebóide, de tamanho maior que o da célula em repouso. Nesta condição a micróglia se apresenta moldável, podendo se apresentar em fenótipos distintos M1 ou M2, com diferentes respostas ao estímulo, assumindo por exemplo, funções de reparo, citotoxicidade, regulação imune e pró-inflamatória (Tang e Le, 2016; Kanazawa et al., 2017; Jiang et al., 2020).

Em seu fenótipo M1, a micróglia apresenta resposta imune pró-inflamatória. Assim libera citocinas como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alpha (TNF α) e também libera mediadores citotóxicos como iNOS, levando a produção de ERO e colaborando com o aumento do estresse oxidativo e com a neuroinflamação (Kanazawa et al., 2017; Block et al., 2007). Por tais aspectos, esse fenótipo é responsável por lesionar células que ainda se mantinham integras pós lesão, agravar o quadro inflamatório, ocasionando morte neuronal e migração células inflamatórias adicionais para o local devido ao dano causado na barreira hematoencefálica (BHE) (Tang e Le, 2016; Jiang et al., 2020).

Com características opostas, o fenótipo M2 apresenta respostas neurotróficas, restauradoras, antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo benéfico para o tecido lesionado (Neumann et al., 2006). A ativação do perfil M2 associa-se com o aumento da síntese de moléculas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-1), além da expressão de citocinas como a interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (Kanazawa et al., 2017).

Se tratando da lesão isquêmica, a micróglia sai do estado de repouso e é ativada, migrando para o local acometido e se torna protagonista da resposta inflamatória do SNC, como mostra a figura 2 (Gaire, 2021). O fenótipo M1 predomina a resposta microglial aguda, principalmente nas primeiras 12 horas, o que acaba exacerbando o ambiente inflamatório e acarretando em uma maior área de lesão. Nos dias seguintes, o perfil M1 demonstra uma tendência

decrecente. Já o fenótipo M2 mostra ativação após o final do primeiro dia, e mantém o aumento nos dias seguintes (Jiang et al., 2020; Kanazawa et al, 2017).

Estudos apontam que a inibição da ativação microglial atenua a lesão cerebral induzida por isquemia, em razão da exacerbação inflamatória causada por M1 (Yrjänheikki et al., 1998; Franco et al., 2012). Em contraste, também existem evidências de que a ativação microglial M2 é necessária para a neurogênese do tecido, reduzir a apoptose neuronal e recuperar a funcionalidade do SNC após isquemia cerebral (Neumann et al., 2006). Por este motivo, estudos que visam estratégias para modular o fenótipo microglial vem crescendo nos estudos de isquemia cerebral (Gaire, 2021; Kanazawa et al, 2017).

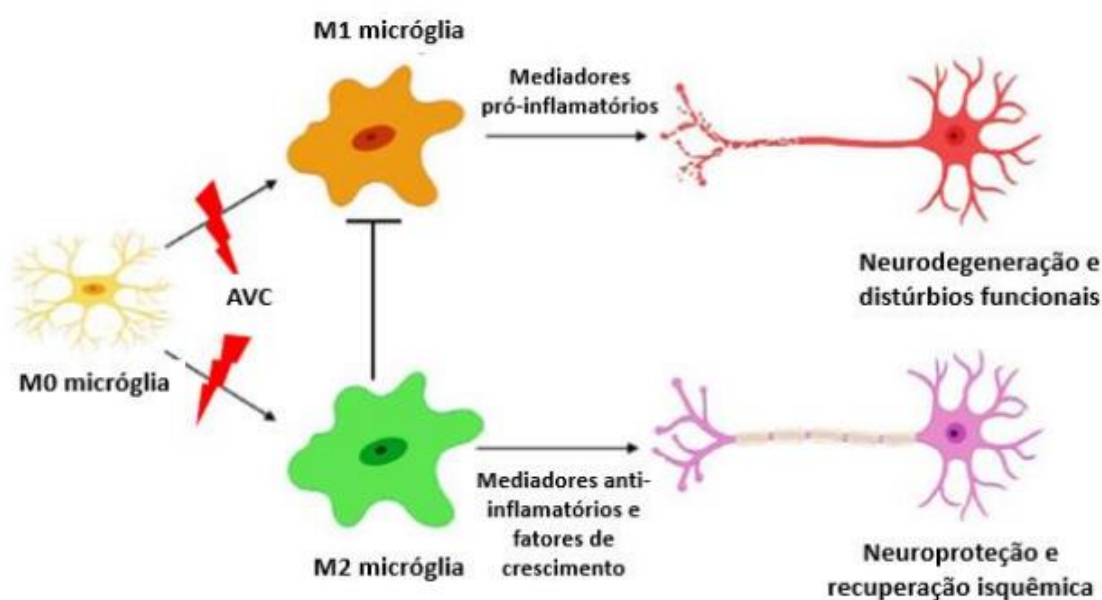


Figura 2: Ativação microglial frente ao AVC. Durante o episódio isquêmico decorrente do AVC, a micróglia é ativada e assume dois diferentes fenótipos. Em M1 suas características pró-inflamatórias levam a liberação de mediadores que resultam em neurodegeneração e alterações funcionais. Em M2 as características anti-inflamatórias e liberação de fatores de crescimento resultam em neuroproteção e recuperação da lesão isquêmica. Adaptada de Gaire (2021).

1.3 MODELO *IN VITRO*

Modelos *in vitro* possibilitaram uma grande compreensão da fisiopatologia das doenças humanas, gerando grandes possibilidades experimentais e de análises. Essa estratégia permite a investigação de mecanismos bioquímicos e moleculares específicos de certa linhagem celular,

sendo mais prático, econômico e possibilita a diminuição do uso de animais em pesquisas (Holloway et al., 2016).

Para mimetizar episódios isquêmicos em culturas celulares, o protocolo de privação de oxigênio e glicose (POG) é adotado em diversas literaturas (Kalda et al., 1998; Antonic et al., 2012; Ferrer-Acosta et al., 2017; Sommer, 2017; Juntunen et al., 2020). As metodologias têm em comum a diminuição da concentração de O₂ por infusão de gás nitrogênio, e a troca do meio de cultura comum, com aporte de nutrientes (Biotina, Vitamina B12 e Ácido Para Aminobenzóico) e glicose, para um meio sem estes componentes (Goldberg e Choi, 1993; Sommer, 2017). No entanto divergências em alguns detalhes são verificadas como, o tempo de protocolo de POG que varia na literatura, podendo ser entre 1 a 24 horas. Após o tempo determinado, as células retornam as condições ideais de cultivo, em estufa padrão e com meio enriquecido com nutrientes e glicose (Holloway et al., 2016).

O retorno as condições padrões se assemelha a reperfusão que acontece após as lesões isquêmicas, o que aumenta a semelhança do modelo com as condições *in vivo* (Goldberg e Choi, 1993). Tem se descrito que o modelo POG provoca excitotoxicidade e aumento de glutamato extracelular, lesão mitocondrial, tumefação celular em 1 hora, seguida de morte celular, liberação de mediadores inflamatórios e estresse oxidativo, todos eventos característicos de lesão de I/R *in vivo* (Kalda et al., 1998; Antonic et al., 2012; Ferrer-Acosta et al, 2017; Juntunen et al, 2020). Hu et al (2012), utilizando modelo POG relataram que a adição de micróglia M1 a cultura de células resultou em um aumento de a morte neuronal, em contraste, a micróglia M2 protegeu neurônios contra os danos da POG.

Diante do exposto, a micróglia é considerada uma peça chave na cascata inflamatória e no desfecho da lesão, sendo um alvo potencial para pesquisas envolvendo tratamentos para isquemias cerebrais (Hu et al., 2012; Gaire, 2021). Para aprofundar os estudos desta linhagem celular *in vitro*, uma das estratégias mais adotadas é a utilização da linhagem celular BV-2 (*mus musculus*), que são micróglias imortalizadas derivadas de cérebros de camundongos saudáveis com 10 dias de idade. Como mostra os estudos de

Zeng e colaboradores (2017), e Fu e colaboradores (2020), que aplicaram a linhagem BV-2 no modelo de POG citado anteriormente.

1.4 PEIXE-ZEBRA

A descoberta e a aprovação de um novo fármaco envolvem uma série de processos, que normalmente passam pela etapa de validação em modelos animais para finalmente, chegarem em humanos. O peixe-zebra (*Danio rerio*), um pequeno teleósteo de água doce, de apenas 3 a 4 cm, pertencente à família *Cyprinidae*, veem sendo utilizado de forma crescente para potenciais validações e pesquisas em diversas áreas da biologia, como: genética e genômica, teratologia, biologia do desenvolvimento, comportamento e toxicologia (Vascotto et al., 1997; Veldman e Lin, 2008).

É possível citar diversos benefícios em se trabalhar com o modelo de peixe-zebra, como: baixo custo animal, demanda de pouco espaço, facilidade de reprodução, rápido desenvolvimento e menor investimento financeiro quando comparado aos roedores (Walcott e Peterson, 2014). Além disso, a pesquisa em diversas áreas da biologia se torna aplicável, já que grandes segmentos dos cromossomos do peixe-zebra se igualam aos cromossomos humanos, e de camundongos (Barbazuk et al., 2000). O Instituto Sanger iniciou em 2001 o sequenciamento do genoma total do peixe-zebra, observando uma homologia de aproximadamente 70-80% com o genoma humano (Stern e Zon, 2003).

Este pequeno teleósteo é muito usado em pesquisas com fármacos, principalmente para fins de triagem medicamentosa, pois é capaz de absorverlos diretamente da água pelas suas brânquias e acumula-los em diferentes tecidos, dentre eles o SNC (Yang et al., 2009). Há também um alto grau de conservação entre humanos e peixes-zebra em respeito às respostas aos medicamentos, o que indica um alto grau de sequência de aminoácidos identificadas em sítios de proteína ativa, onde muitos medicamentos se ligam (Milan et al., 2003).

No que se trata de doenças neurológicas, o peixe-zebra vem se fortalecendo como um modelo alternativo importante. Isso se deve ao alto grau de similaridade entre o SNC do peixe-zebra e dos seres humanos, o tornando

capaz de fornecer dados fundamentais sobre o desenvolvimento e função cerebral, elucidar mecanismos neurais e moleculares de doenças neurológicas, além de triagem medicamentosa (Chen et al., 2021). Diversos sistemas de neurotransmissão amplamente estudados em mamíferos já foram identificados e descritos em peixe-zebra, tais como: colinérgico (Behra et al., 2002), dopaminérgico (Boehmler et al., 2004), GABAérgico (Kim et al., 2004), histaminérgico (Kaslin e Panula, 2001), serotoninérgico (Rink e Guo, 2004), glutamatérgico (Rico et al., 2010).

Pesquisas envolvendo danos cerebrais de lesão I/R no modelo de peixe-zebra são pouco mencionadas na literatura. Yu e Yang (2011), padronizaram pela primeira vez o protocolo de hipóxia em peixe-zebra a partir da infusão de nitrogênio em tanque de água vedado, e este foi reproduzido e adaptado por Braga et al (2013). Para que o peixe-zebra se iguale as condições impostas em pacientes após quadro de isquemia cerebral, adotou-se a faixa de oxigênio relatada como hipóxia severa de curto prazo em peixe-zebra, que é de <1,5mg L de O₂ dissolvido na água (Ngan e Wang, 2009). Essa faixa é capaz de levar a perda de consciência nos animais em poucos minutos, e pode resultar em óbito. Os resultados obtidos demonstram que a fisiologia e o comportamento do peixe-zebra são afetados pela diminuição drástica dos níveis de O₂, de maneira semelhante aos modelos tradicionais de hipóxia-isquemia (Yu e Yang, 2011; Braga et al., 2013).

1.5 MINOCICLINA

A minociclina é um derivado de tetraciclina semissintética, que tem sido utilizado como um medicamento antimicrobiano para o tratamento de diversas doenças infecciosas (Garrido-Mesa et al., 2013). É um fármaco altamente lipofílico, capaz de cruzar a BHE, e possui meia-vida variável entre 15 e 23 horas (UpToDate, 2021). Além de seus efeitos antimicrobianos, foi reconhecido que o fármaco possui efeitos anti-inflamatórios, antiapoptóticos e neuroprotetores em estudos experimentais e clínicos de diferentes patologias neurológicas, incluindo a lesão cerebral isquêmica (Garrido-Mesa et al., 2013; Chen et al., 2017; Malhotra et al., 2018).

Em modelos experimentais de distúrbios neurológicos agudos, a minociclina se mostrou um importante inibidor da ativação da micróglia, sendo essa característica associada fortemente a sua capacidade neuroprotetora (Yrjanheikki et al., 1999; Guimaraes et al., 2010). Sobre a mitocôndria, exerce proteção, inibindo a ativação das caspases 1 e 3 e inibindo a liberação do citocromo C (Yong et al., 2004; Matsukawa et al., 2009). Além disso, reduz a lesão excitotóxica e protege o cérebro contra estresse oxidativo (Morimoto et al., 2005; Heo et al., 2006; Guimaraes et al., 2010). Por fim, é capaz de aumentar da expressão de BDNF (Wen et al., 2015).

Em pesquisas com foco no AVC, a minociclina é descrita como um agente terapêutico promissor na atenuação da neuroinflamação, principalmente em razão da sua ação sob a micróglia. Estudos pré-clínicos relatam que a minociclina inibe a ativação microglial, reduzindo a morte celular e conseqüentemente, diminuindo a área de infarto após a oclusão da artéria cerebral média (MCAO) (Franco et al., 2012; Cardoso et al., 2013). Outros estudos concluíram que a supressão da ativação microglial pela minociclina resultou também em níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias (Yrjänheikki et al., 1998; 1999; Bye et al., 2007; Yang et al., 2015). Em estudos clínicos, os dados ainda são limitados, mas em sua maioria revelam que o tratamento com minociclina melhora significativamente o resultado neurológico em pacientes isquêmicos agudos (Malhotra et al., 2018; Naderi et al., 2020).

A única droga aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento do AVC agudo é o ativador do plasminogênio tecidual (tPA), um agente trombolítico. Porém, a reperfusão que ocorre após a terapia trombolítica pode exacerbar a lesão cerebral causada pela isquemia cerebral (Piccardi et al., 2018). Por este motivo, a administração de neuroprotetores como a minociclina se torna tão importante, e vira foco de pesquisas que visam reduzir a lesão neuronal conseqüente da neuroinflamação e agravada pela reperfusão.

1.6 JUSTIFICATIVA

Pesquisas apontam a minociclina como um fármaco promissor no tratamento da neuroinflamação resultante de episódios de lesão I/R cerebral. O fármaco apresenta ação anti-inflamatória e neuroprotetora, com destaque para a inibição da ativação microglial.

Os estudos pré-clínicos de isquemias cerebrais em modelos de roedores já estão bem descritos na literatura, assim como o uso da minociclina no tratamento do mesmo. A partir desta afirmação, o presente trabalho propôs dois modelos alternativos, *in vitro* utilizando a linhagem microglial BV-2, e *in vivo* utilizando o peixe-zebra, com intuito de aprofundar o entendimento da ação da minociclina perante a lesão de I/R. E além disto, corroborar com os achados na literatura, e possibilitar a validação dos modelos alternativos propostos para que sejam utilizados em demais pesquisas.

Para o modelo *in vitro*, a escolha da linhagem microglial BV-2 teve o intuito de investigar de forma particular a resposta desta célula, que apresenta papel tão importante na ação da minociclina e na fisiopatologia da lesão I/R cerebral. Já o modelo *in vivo* com o peixe-zebra representa a parte inovadora deste estudo, que apostou nas vantagens do modelo para estudos neurológicos, realizando pela primeira vez a administração da minociclina em peixe-zebra para tratamento de isquemia cerebral. Ambos os modelos experimentais se complementam com suas particularidades, enriquecendo os resultados obtidos pelo trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação neuroprotetora da minociclina em diferentes modelos experimentais de lesão de isquemia e reperfusão cerebral

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de indução de lesão I/R cerebral tanto em modelo experimental *in vitro*, quanto *in vivo* em peixe-zebra.

- Avaliar se a minociclina promove efeito protetor na viabilidade celular no modelo de lesão I/R cerebral *in vitro* e *in vivo*.

- Avaliar se a minociclina promove efeito protetor sobre o estresse oxidativo em modelo de lesão I/R cerebral *in vitro* e *in vivo*.

- Avaliar se a minociclina é capaz de regular a liberação de glutamato em modelo de lesão I/R cerebral *in vitro* e *in vivo*.

- Avaliar se a minociclina interfere na ativação microglial em modelo de lesão I/R cerebral *in vitro*.

- Avaliar se a minociclina promove efeito protetor sobre parâmetros inflamatórios em modelo de lesão I/R cerebral *in vitro*.

- Avaliar se a minociclina promove efeito protetor em parâmetros motores avaliados em modelo de lesão I/R cerebral *in vivo*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PRIMEIRA ETAPA: EXPERIMENTOS *IN VITRO* EM LINHAGEM BV-2 DE MICRÓGLIAS

3.1.1 Linhagem BV-2

A linhagem celular microglial BV-2 (*Mus musculus*) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. BV-2 é uma linhagem celular de micróglias imortalizadas, derivadas de cérebros de camundongos saudáveis com 10 dias de idade. As células foram cultivadas conforme o *Data Sheet* 0356-BV-2, em meio RPMI (Sigma), suplementado com soro bovino 10%, 100 U/mL de penicilina (Hyclone, Logan, UT, EUA) e 10 U/mL de glutamax (Invitrogen [Thermo Fisher Scientific]) a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂.

3.1.2 Modelo de protocolo de privação de oxigênio e glicose *in vitro*

As células são cultivadas por aproximadamente uma semana até atingirem a confluência desejada (10.000 células por poço em placa de 96 poços, condas em câmara de Neubauer), para então serem utilizadas nos experimentos. No presente estudo, adaptou-se o protocolo de privação de oxigênio e glicose (POG) segundo Goldberg e Choi (1993). Primeiramente, as células BV-2 foram retiradas das condições padrões de cultivos e colocadas em meio RPMI sem soro bovino fetal (SBF) e sem glicose em uma estufa umidificada, a 37°C. Esta estufa foi perfundida com gás nitrogênio, e seus níveis foram regulados com o auxílio do oxímetro, até que chegasse na porcentagem desejada, de 95% de nitrogênio e 5% de O₂. As células foram mantidas nestas condições por 4 horas, tempo necessário para causar isquemia celular.

Após as 4 horas de POG, as células retornaram ao meio RPMI com glicose e nutrientes, e para a estufa de cultivo padrão. Este retorno a situação de normóxia mimetiza a reperfusão da lesão de I/R. Vinte e quatro horas após passarem pelo protocolo POG, as células foram retiradas da placa de 96 poços e armazenadas em -20°C para as análises.

3.1.3 Desenho experimental BV-2

As células foram divididas em quatro grupos: Controle, Controle+minociclina, Hipóxia, Hipóxia+minociclina. Os grupos Hipóxia passaram pelo protocolo descrito acima, conforme padronizado por Goldberg e Choi (1993). Os grupos Controles se mantiveram cultivados em meios com condições padrões para sobrevivência.

Os grupos tratados com minociclina, receberam o fármaco na concentração 50 μ M por poço por 24h. O tratamento com minociclina foi baseado na literatura de Rueger et al (2012), que a partir de uma análise de curva de dose, afirmou que concentrações de 10 e 50 μ M de minociclina aumentaram significativamente a viabilidade celular. O grupo Hipóxia+minociclina foi exposto ao fármaco logo em sequência do protocolo POG.

As amostras das células cultivadas no experimento foram coletadas 24h após o protocolo POG e armazenadas para as análises conforme a figura 3. As análises realizadas foram: viabilidade celular, imunofluorescência, níveis de citocinas inflamatórias, níveis de glutamato e parâmetros de estresse oxidativo.

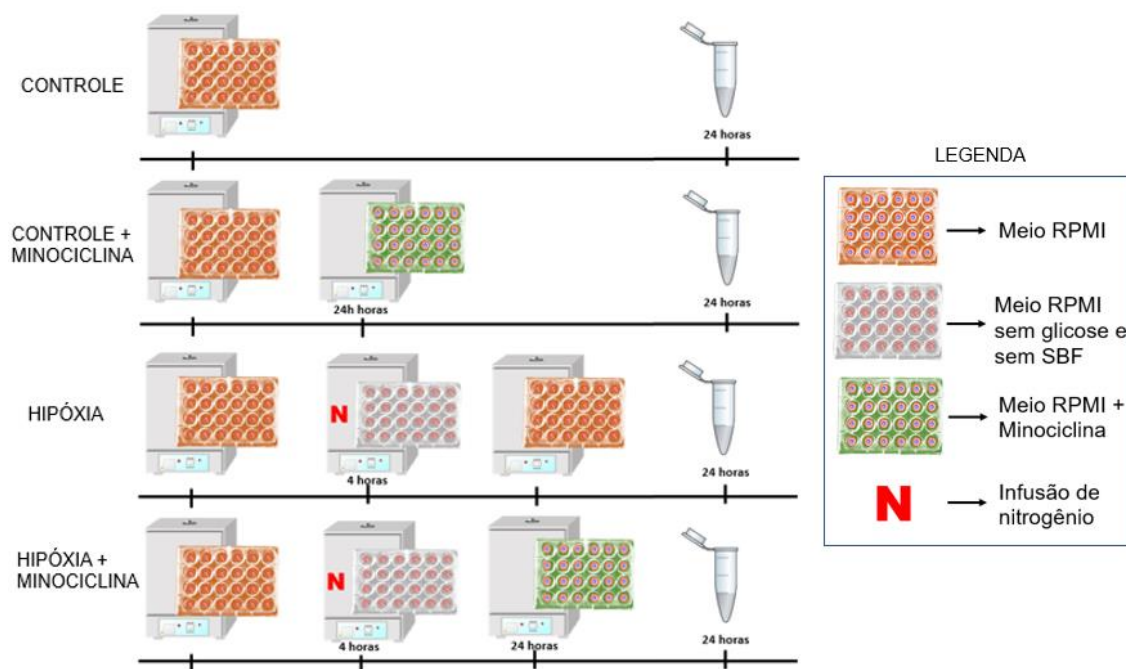


Figura 3: Desenho experimental da primeira etapa: experimento *in vitro* com células BV-2 (micróglias). Ilustração dos quatro grupos, e da sequência experimental de cada um deles. A placa com o meio alaranjado representa o meio de cultura RPMI comum para cultivo. A placa com meio de cultura cinza representa o meio RPMI sem glicose e nutrientes. A placa com meio de cultura verde representa o tratamento com a minociclina. A letra "N" na estufa representa a infusão de gás nitrogênio da estufa. O eppendorf representa a retirada da célula da placa, e armazenamento para as análises no tempo de 24 horas após protocolo POG. Apenas o grupo Hipóxia e Hipóxia+minociclina passaram pelo protocolo POG. O grupo Controle+minociclina e Hipóxia+minociclina ficaram em contato com o meio em que a minociclina de 50µm estava dissolvida por 24h, o restante voltou para o meio padrão RPMI. Fonte: Da autora, 2022.

3.2 SEGUNDA ETAPA: EXPERIMENTOS *IN VIVO* EM MODELO EXPERIMENTAL DE PEIXE-ZEBRA

3.2.1 Peixe-zebra

Para a realização deste projeto, foram utilizadas 230 peixes-zebras (*Danio rerio*) adultos (com aproximadamente 4 meses de idade) de ambos os sexos da linhagem heterogênea do fenótipo short-fin (SF). Divididos em 4 grupos: Controle; Controle+minociclina; Hipóxia; Hipóxia+minociclina.

Os animais foram obtidos através do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e mantidos no Laboratório de Psiquiatria Translacional, da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), em aquários de 50 litros, com água decolorada e continuamente aerada, em um número de 30 animais por aquário. A temperatura da água foi regulada em $28,5 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo os peixes mantidos em ciclo de claro-

escuro de 14h/10h controlado por fotoperíodo (luzes acesas às 7h; luzes apagadas às 21h). As condições físico-químicas da água foram averiguadas antes e depois dos experimentos. E a alimentação dos peixes ocorreu duas vezes por dia com artêmias. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental que foi submetido para a Comissão de Ética de Uso em Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, com o número de protocolo de aprovação: 52/2020 (Anexo A) e 66/2021 (Anexo B).

3.2.2 Modelo de protocolo de hipóxia em peixe-zebra

Para reproduzir a condição de isquemia cerebral em modelo de peixe-zebra, adotou-se o protocolo de hipóxia padronizado por Braga e colaboradores (2013). Para isto, foi utilizado um tanque adaptado com duas aberturas, uma para saída de oxigênio e outra para acoplar uma bomba de gás nitrogênio e o sensor do oxímetro. Neste tanque foi adicionado 1,5 litros de água. O gás nitrogênio ao ser perfundido no tanque, diminui o oxigênio dissolvido na água. A taxa de oxigenação da água foi mantida inferior a 1,5 mg/L de oxigênio dissolvido, esta taxa já é relatada em literatura como uma hipóxia grave em peixe-zebra (Ngan e Wang, 2009). A oxigenação da água foi monitorada por todo o processo utilizando o oxímetro (AKSO, AKLA- 63114). E sempre que necessário o nitrogênio foi perfundido no tanque, até atingir a taxa desejada inferior a 1,5 mg/L.

Após a estabilização da faixa de oxigênio dissolvido na água, adicionou-se dois peixe-zebra por vez ao tanque, e este foi selado em sequência para manter um ambiente propício a hipóxia. No tanque, os animais passam por estágios de comportamento característicos de lesão I/R cerebral, como descrito por Braga et al (2013). Primeiramente nadam no topo e apresentam agitação, após alguns minutos perdem a postura, e por fim permanecem imóveis, com a respiração mais lenta. É neste último estágio que o peixe-zebra deve ser retirado do tanque de nitrogênio, e colocado em um aquário padrão, com condições normais de oxigênio. A retirada do tanque no tempo ideal é crucial para a sobrevivência do animal, por isso a faixa de mortalidade deste protocolo de lesão I/R cerebral pode chegar a 40% (Yu et al., 2011).

3.2.3 Desenho experimental peixe-zebra

Os 230 peixes-zebras (*Danio rerio*), foram divididos em 4 grupos: Controle (n=48); Controle+Minociclina (n=48); Hipóxia (n=67); Hipóxia+Minociclina (n=67). Os grupos submetidos a lesão I/R cerebral passaram pelo protocolo de hipóxia descrito acima, conforme padronizado por Braga e colaboradores (2013), por isso o N por grupo foi maior em relação ao controle, considerando o risco de mortalidade do modelo (Yu et al.,2011). Os grupos mantidos em condição “controle” passaram pelo tanque (sem nitrogênio) apenas para igualar o estresse, e em seguida permaneceram alojados nos aquários comuns de condição padrão. Os grupos tratados com minociclina receberam o fármaco na concentração de 1mg/L, diluído junto a água do aquário, por 1 hora.

Para estabelecer a concentração de 1mg/L de minociclina, foi previamente avaliado o efeito do fármaco em quatro concentrações diferentes, de 90mg/L, 50mg/L, 10mg/L e 1mg/L. Ambas concentrações foram analisadas em condições de normóxia e hipóxia a partir da técnica de TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride). De forma quantitativa é possível mensurar a quantidade de TTC que foi convertido em formazan por mitocôndrias viáveis, possibilitando avaliar a viabilidade celular como parâmetro para toxicidade da minociclina. A concentração de 1mg/L foi escolhida por apresentar boa viabilidade nas duas condições. Com destaque para a condição de hipóxia, em que esta concentração de minociclina foi capaz de obter resultado semelhante ao controle. O tempo de 1h foi definido após observação de comportamento do peixe-zebra.

O grupo Hipóxia+minociclina foi exposto ao fármaco logo em sequência do protocolo de hipóxia. Ao ser retirado do tanque de nitrogênio, o peixe-zebra foi colocado em um aquário com 1mg/L de minociclina diluída em 1 litro de água, durante 1 hora. Ao finalizar 1 hora, os peixes foram eutanasiados, assim como os demais grupos 1 hora após passarem pelo tanque. Doze animais de cada grupo passaram pelo teste comportamental de *novel tank*, ao qual foram submetidos rapidamente, para que em seguida fosse realizada a eutanásia. O

3.3.1 Viabilidade celular por MTT

O ensaio MTT envolve a conversão do corante amarelo solúvel em água MTT [brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] em um formazan roxo insolúvel pela ação de enzimas mitocondriais. O MTT foi adicionado a uma concentração de 1 mg / ml nas placas, 24 horas após passarem pelo protocolo POG, e incubado por 4 horas em estufa de cultivo celular. Foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver o MTT e formar os cristais de formazan insolúveis. A leitura da placa foi realizada em absorvância de 570 nm (Andrighetti-Fröhner et al., 2003).

3.3.2 Viabilidade celular por TTC

Após eutanásia os cérebros inteiros foram imediatamente imersos em frascos contendo 1 mL de solução TTC de 2% em Tampão fosfato-salina (PBS) (pH 7.4) a 37 °C por 40 min. Os frascos foram cobertos com papel alumínio devido à propriedade sensível à luz do TTC. Após 40 min o TTC foi removido e 10% de formalina em PBS (pH 7.4) foi adicionada para acabar com a reação enzimática. Os cérebros foram secos a 40 °C por 30min e os tecidos foram pesados. Em seguida, os cérebros foram transferidos para 96 placas de poços e incubados com 200 µL de DMSO. As placas foram protegidas da luz e mantidas sob constante agitação por 4h para solubilizar o formazan produzido a partir da reação TTC. A absorção do sobrenadante foi lida a 490 nm em um leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em absorvência por peso seco de tecido (g), que foram normalizados em percentagem em relação ao controle (Braga et al, 2013).

3.3.3 Visualização da área isquêmica por coloração de TTC

O TTC é um reagente que pigmenta a região cerebral que apresenta capacidade de gerar formazan, que corresponde as células viáveis, sendo assim, as células lesionadas pela isquemia ficam sem pigmentação. O cérebro integro foi submetido ao TTC em solução de cloreto de 0,1% de TTC (Zhang e Jun, 2012), e em seguida o tecido foi fixado em 4% de formaldeído. O cérebro foi fatiado ao meio para melhor observação do resultado, e para auxiliar na precisão das fatias foi utilizado o gel de acrilamida 20% como base rígida. Após

fatiado, imagens foram registradas com auxílio de um microscópio estereoscópio para observar o tamanho da área de infarto.

3.3.4 Ensaio de imunofluorescência

As amostras de BV-2 foram fixadas e coradas com o anticorpo IBA-1. As amostras foram lavadas em PBS e incubadas com AlexaFluor 647 (Thermo Fisher Scientific; cat. A32787; 1:800) ou AlexaFluor 488 (Abcam; cat. Ab150061; 1:800) e anticorpos secundários IgG anti-coelho. de IgG de burro AlexaFluor 488 (Abcam; cat. Ab150065; 1:800) ou AlexaFluor 594 (Abcam; cat. Ab150076; 1:800). Os núcleos foram corados com DAPI (Life Technologies; cat. D1306; 1:1000). As imagens foram adquiridas pelo Axio Observer combinado com um dispositivo confocal LSM 780 com ampliação de 630 × (Carl Zeiss). A marcação de IBA-1 foi identificada como a área de co-localização de DAPI e quantificadas usando o software Fiji/ImageJ.

3.3.5 Dosagem de proteínas

A quantidade total de proteínas de cada técnica foi mensurada usando o ensaio de proteína de Lowry. Reagente fenol de Folin foi adicionado a amostras, sua principal função é ligar-se a proteínas, onde ele é posteriormente reduzido. A alteração de cor resultante a partir de amarelo para azul pode ser seguido através da medição da absorbância a 700 nm. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão de proteínas (Lowry et al., 1951).

3.3.6 Dosagem de citocinas por ELISA

Os níveis das citocinas IL-6, IL-1 β e IL-10 em amostras de células BV-2 foram determinados através do kit comercial de ensaio de imunoabsorção enzimática ELISA (Wood et al., 2019). As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato salina. Foi adicionado primeiramente o diluente em cada poço e posteriormente a amostra, padrão ou controle. Em seguida, a placa foi coberta e incubada por duas horas a temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas com tampão de lavagem. IL-6, IL-1 β e IL-10 foram acrescentados

em cada poço e novamente incubados por 2h a temperatura ambiente. Depois de lavadas, foi adicionada solução substrato em cada poço e incubada por mais 30 min, a temperatura ambiente. Depois da incubação, foi adicionada solução stop para parar a reação. A densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 450 nm.

3.3.7 Níveis de glutamato por kit de atividade de GDH

Conforme informado no boletim técnico do Kit de Ensaio de Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) (MAK099) Sigma-Aldrich, o tecido (50 mg) e as células (1×10^6) foram ser homogeneizados em 200 μ L de Tampão de Ensaio GDH gelado. Foi realizada uma curva padrão a partir da solução padrão do kit gerando 0 (branco), 2, 4, 6, 8 e 10 nmol / poço padrões. Em cada poço foi adicionado 2 μ L do controle positivo aos poços e 48 μ L de amostra, gerando um volume final de 50 μ L. Uma solução principal com o Tampão de ensaio GDH, Desenvolvedor GDH e glutamato é formado conforme as quantidades descritas no kit. Essa solução principal foi adicionada em todos os poços e a placa agitada levemente em seguida. Incubou-se a placa a 37 ° C e após 3 minutos, foi tomada a medição inicial (T inicial) na absorbância de 450 nm. Continuando a incubar a placa a 37 ° C foram tomadas medições em 450 nm a cada 5 minutos até o valor de a amostra mais ativa ser maior que o valor do padrão mais alto (10 nmole / poço). O cálculo da atividade é feito primeiramente pela subtração do T final e T inicial. Em seguida utilizou-se a equação: Atividade GDH = B \times Fator de Diluição de Amostra / (Tempo de reação) \times V. em que B = Quantidade (nmol) de NADH gerado entre T inicial e T final. O Tempo de reação = T final - T inicial (minutos) e o V = volume de amostra (mL) adicionado ao poço.

3.3.8 Oxidação por DCFH

A produção de espécies reativas em amostras de BV-2 e em cérebro total de peixe-zebra foi determinada de acordo com o método de Ali, LeBel e Bondy (1992), utilizando-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA). Nas alíquotas das amostras, adicionou-se a forma diacetato do DCF, a qual é permeável à membrana celular, e estas foram incubadas durante 30 min a 37

°C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCF-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclofluoresceína (DCF). A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 (excitação) e 535 nm (emissão). A curva de calibração foi realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 µM) e os resultados estão expressos como pmol de DCF.mg de proteína.

3.3.9 Conteúdo de sulfidril

Para determinação do conteúdo de grupos sulfidril nas amostras de BV-2 e em cérebro total de peixe-zebra, as amostras foram incubadas tampão PBS com EDTA 1mM (pH 7,4). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto. Após foi adicionado o DTNB, reagente de cor, que foi reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo (TNB), que foi lido espectrofotometricamente a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol de TNB.mg de proteína-1 (Aksenov; Markesbery, 2001).

3.3.10 Níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para determinação dos níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), os cérebros totais foram homogeneizados em tampão PBS gelado (pH 7,4). Logo após o homogeneizado foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec®) a 10 % com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, SigmaAldrich® St. Louis, MO, EUA) 0,67 % na proporção de 1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 2 horas e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS.mg de proteína-1 (Esterbauer e Cheeseman, 1990). Em amostras de BV-2 não foi

possível a realização da técnica, pois os componentes do meio RPMI interferiram na leitura.

3.3.11 Atividade da Catalase

A atividade enzimática da catalase (CAT) em amostra de BV-2 e cérebro total de peixe-zebra foi determinada através do método de Aebi (1984). Foi adicionado na amostra, Triton 0,1 % seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado H₂O₂ 30% (v/v). Este meio foi colocado em cubeta de quartzo e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorvância do H₂O₂ a 240 nm, à temperatura ambiente, durante 180 segundos. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção do H₂O₂ de 43,6 mM⁻¹cm⁻¹. Os resultados da atividade enzimática estão expressos em U.mg de proteína⁻¹ (unidade de atividade da CAT por mg de proteína).

3.3.12 Atividade da SOD

A atividade da Superóxido dismutase (SOD) em amostra de BV-2 e cérebro total de peixe-zebra foi determinada de acordo com Bannister e Calabrese (1987). Primeiramente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Após, foram adicionados à amostra CAT 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480 nm à temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U.mg de proteína⁻¹ (unidade de atividade da SOD por mg de proteína).

3.4 COMPORTAMENTO MOTOR DE PEIXE-ZEBRA APÓS PROTOCOLO DE HIPÓXIA

A avaliação comportamental dos animais ocorreu de acordo com o método previamente descrito por Rosemberg e colaboradores (2011). Após o

período de execução do protocolo de hipóxia, os animais foram transferidos ao aparato do *novel tank*, cujo formato trapezoidal possui dimensões previamente padronizadas na literatura (23,9 cm de comprimento na parte inferior x 28,9 cm na parte superior x 15,1 cm de altura e 15,9 cm na diagonal, possuindo 7,4 cm de profundidade na parte superior e 6,1 cm na parte inferior) (Levin et al., 2007). O aquário foi preenchido com água até 1,5 L e dividido virtualmente em três áreas verticais idênticas (inferior, central e superior) contendo cinco sessões horizontais por área. O perfil comportamental dos animais foi analisado individualmente e filmado por um período de 6 minutos, sendo avaliados os seguintes parâmetros: tempo de mobilidade, distância percorrida, tempo nas áreas do fundo, centro e topo e número de entradas nas áreas no fundo, centro e topo. Estes parâmetros são escolhidos devido ao repertório comportamental do peixe-zebra e baseados na tendência natural do animal em primeiramente explorar a área inferior do aparato e posteriormente transitar nas áreas superiores (Wong et al., 2010). Todos os parâmetros comportamentais foram quantificados através de análise automatizada utilizando o software ANY-maze® (Stoelting, CO, EUA).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram apresentadas na forma de média \pm erro padrão e comparadas com o teste de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey quando necessário. Imagens de imunofluorescência foram quantificadas com auxílio do software ImageJ. Todos os testes foram analisados e gráficos confeccionados no software GraphPad Prism 4.0. Em todas as análises foi adotado como nível para significância estatística um valor de $p < 0,05$ e um N mínimo de 5.

4. RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR EM LINHAGEM BV-2

A análise de viabilidade celular mensurada pela técnica de MTT foi realizada 24h após as células finalizarem o protocolo POG (figura 5). O grupo hipóxia apresentou redução significativa dos níveis MTT em formazan quando comparado aos grupos controles ($p < 0,0001$). Já o grupo Hipóxia+minociclina apresentou um aumento significativo em comparação ao grupo Hipóxia, sendo o fármaco capaz de reverter o dano após hipóxia ($p = 0,0212$). Observa-se também uma redução significativa quando comparado ao grupo Controle+minociclina ($p = 0,0328$).

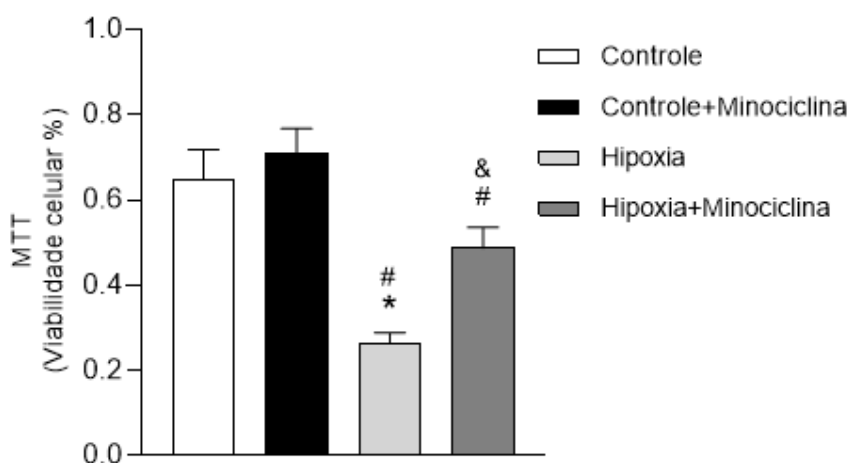


Figura 5: Efeito *in vitro* da minociclina sobre a viabilidade celular em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em porcentagem. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle+minociclina. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo hipóxia (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.2 MORFOLOGIA CELULAR PÓS PROTOCOLO POG

Utilizando um microscópio óptico, foram realizadas imagens em aumento de 40x, de cada grupo (figura 6). Após as 24h de protocolo POG, foi possível observar alterações na morfologia para os grupos Hipóxia quando comparados aos Controles. Dentre as alterações observadas, a hipóxia foi capaz de promover modificações consideradas características de micróglia ativada, tais como seu formato amebóide e arredondado, e apresentando redução e perda de ramificações, características de micróglia em repouso. O grupo relacionado ao

teste da minociclina isoladamente, assim como no grupo tratado com o fármaco após o protocolo POG, não foram observadas alterações no aspecto morfológico celular.

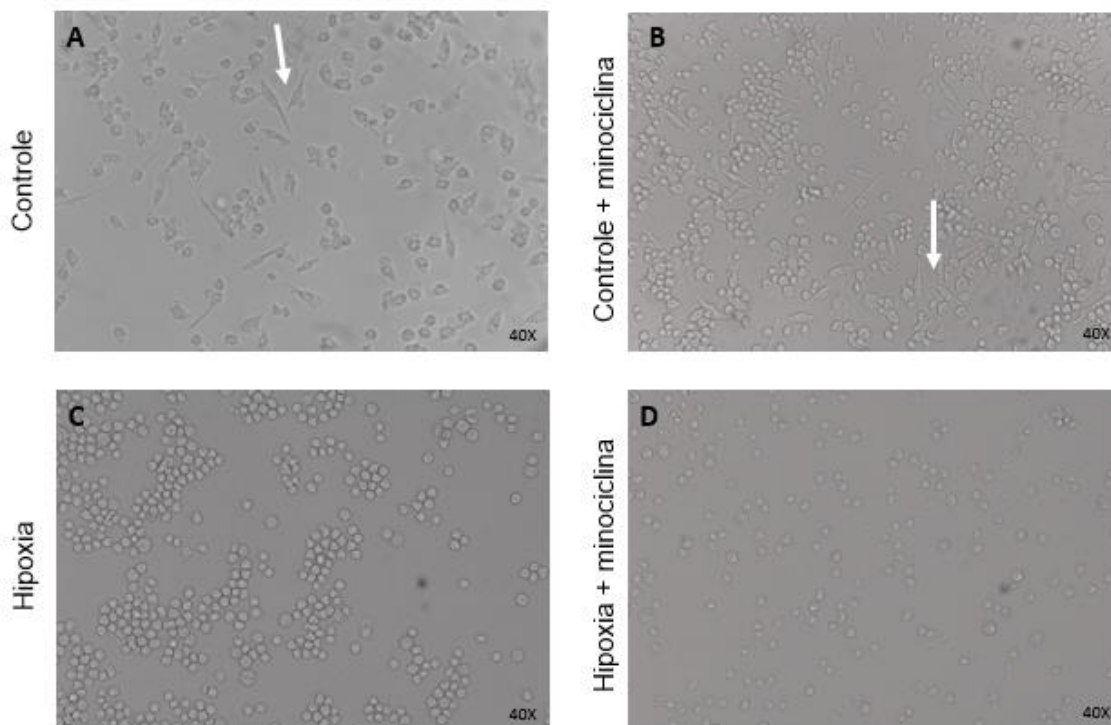


Figura 6: Efeito *in vitro* da minociclina sobre as características morfológicas de cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG. As imagens foram obtidas no aumento de 40x. Os resultados representam uma imagem representativa para de cada grupo avaliado sendo: **A** representa o grupo Controle; figura **B** representa o grupo Controle+minociclina; figura **C** representa o grupo Hipóxia e figura **D** representa o grupo Hipóxia+minociclina. As setas indicam micróglia em repouso, com característica estrelada.

4.3 ATIVAÇÃO MICROGLIAL

A detecção da ativação microglial foi avaliada por imunofluorescência, utilizando dois imunomarcadores, DAPI como marcador de núcleo e IBA-1 como marcador de micróglia ativada (figura 8). As imagens são mostradas em 40 x apresentando a sobreposição dos dois imunomarcadores em MERGE, e quantificada pelo ImageJ. Os resultados permitem observar uma diferença significativa de ativação microglial para o grupo Hipóxia em relação ao controle ($p = <0,0001$) e Controle+minociclina ($p = 0,0050$). O grupo Controle+minociclina também apresentou um aumento significativo para a intensidade dos marcadores DAP/IBA-1 quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0175$). Já o grupo Hipóxia+minociclina apresentou uma redução significativa da marcação

de ativação microglial quando comparado ao grupo Hipóxia, indicando a reversão pela minociclina perante o efeito do insulto de hipóxia ($p = 0,0016$) (figura 7).

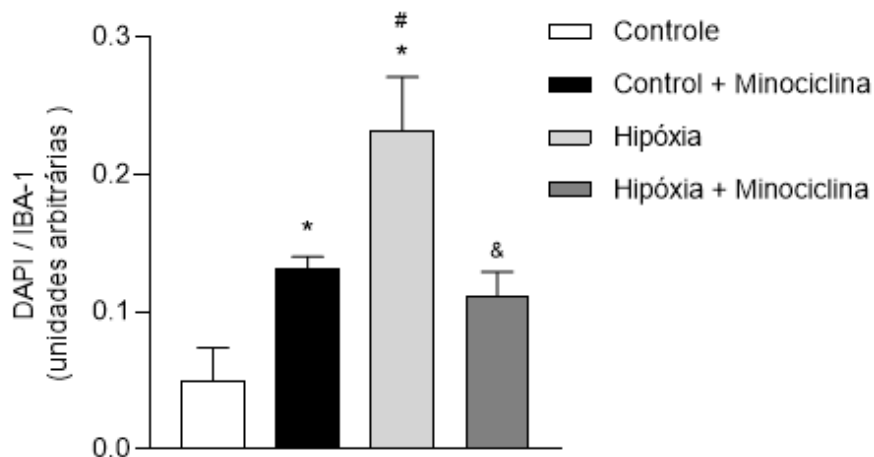


Figura 7: Efeito *in vitro* da minociclina sobre a razão DAPI/IBA-1, em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG. Os resultados representam média \pm desvio padrão. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle+minociclina. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo Hipóxia (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

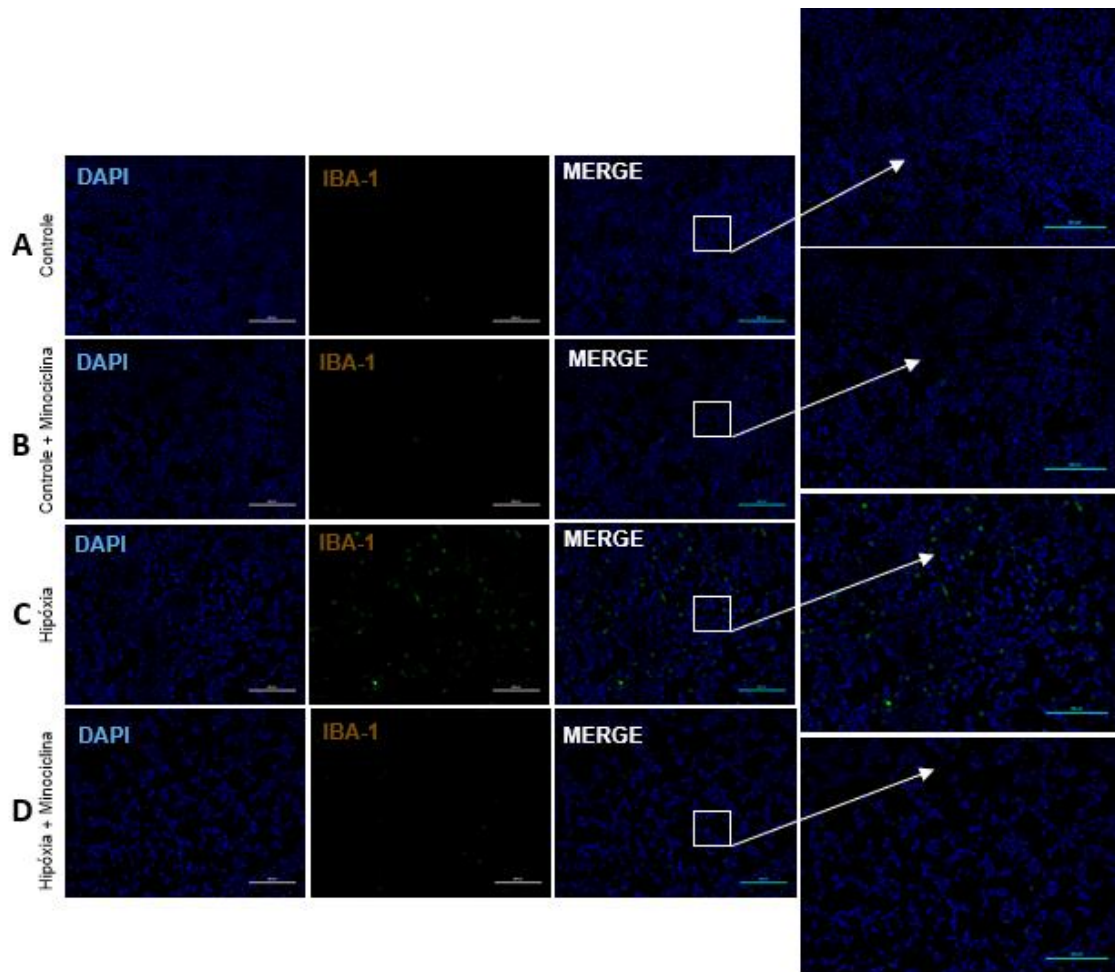


Figura 8: Efeito *in vitro* da minociclina sobre a ativação microglial com relação aos imunomarcadores DAPI/IBA-1 em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG. Imagens representativas dos imunomarcadores em cada grupo. O MERGE representa a sobreposição de DAPI e IBA-1. É possível visualizar uma marcação mais intensa de IBA-1 no grupo Hipóxia, e a redução da marcação no grupo Hipóxia+minociclina. Figura **A** representa o grupo Controle; figura **B** representa o grupo Controle+minociclina; figura **C** representa o grupo Hipóxia e figura **D** representa o grupo Hipóxia+minociclina.

4.4 NÍVEIS DE GLUTAMATO EM BV-2

A quantificação do glutamato total foi realizada por meio da reação de conversão do Glu em α -cetogluturato, catalisada pela enzima L-glutamato desidrogenase (GDH). Foi observado um aumento significativo nos níveis de glutamato para o grupo Hipóxia quando comparado ao grupo Controle ($p=0,0275$), o grupo tratado com a minociclina não apresentou resultados significativos (figura 9).

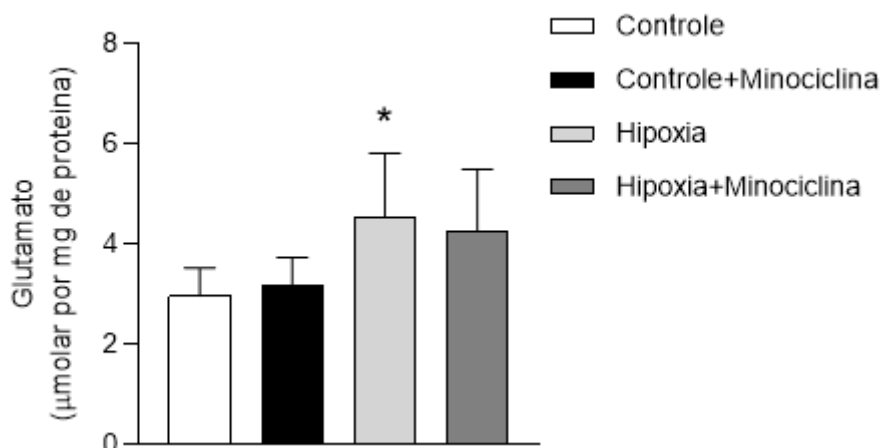


Figura 9: Efeito *in vitro* da minociclina sobre os níveis de glutamato em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.5 AVALIAÇÃO DE PARAMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS BV-2

4.5.1 Oxidação de DCFH

Com o objetivo de verificar a formação de espécies reativas nos diferentes grupos, foi quantificado os níveis de oxidação de DCFH (figura 10). O grupo Hipóxia apresentou maior oxidação em comparação com o grupo controle ($p = 0,0049$) e Controle+minociclina ($p = 0,0030$). O grupo Hipóxia+minociclina mostrou que o fármaco reverteu o parâmetro, diminuindo significativamente a oxidação de DCFH ($p=0,0217$).

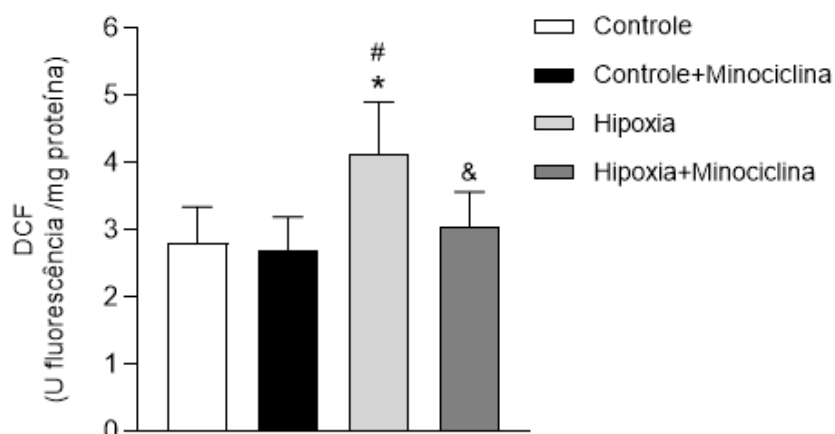


Figura 10: Efeito *in vitro* da minociclina sobre a oxidação de DCFH em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle+minociclina. & $p < 0,05$ em comparação ao grupo Hipóxia (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.5.2 Conteúdo de grupos sulfidrilas

Com a análise do conteúdo de grupos sulfidrilas, um marcador de dano oxidativo proteico, foi possível observar que o grupo Hipóxia apresentou uma redução significativa do conteúdo em relação ao grupo Controle ($p = 0,0130$) e controle+minociclina ($p = 0,0115$). O grupo Hipóxia+minociclina não apresentou resultado significativo neste parâmetro (figura 11).

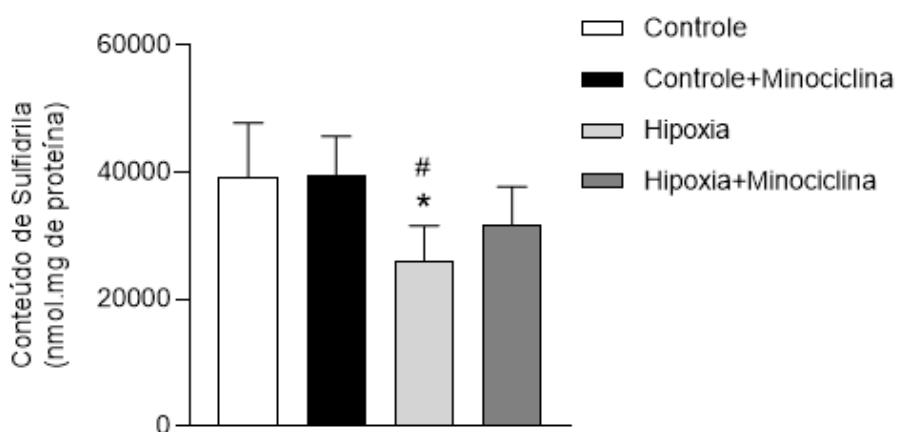


Figura 11: Efeito *in vitro* da minociclina sobre o conteúdo de sulfidrilas em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle+minociclina. (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes

Foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas por meio da atividade de SOD e CAT. Ambas não apresentaram diferença significativa de atividade entre os grupos (figura 12).

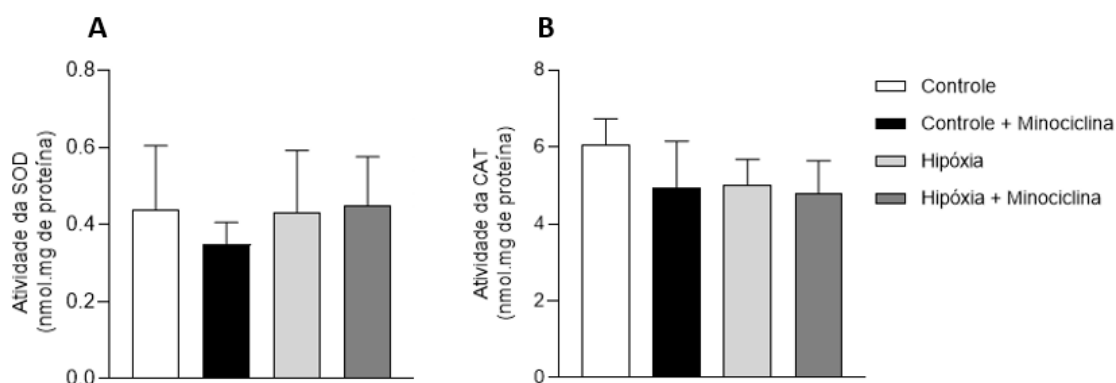


Figura 12: Efeito *in vitro* da minociclina sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG. Figura **A** representa o gráfico da atividade de SOD; Figura **B** represente o gráfico de atividade de CAT. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína. Não houve diferença significativa entre os grupos ao adotar $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.6 NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS BV-2

Três citocinas inflamatórias foram dosadas para análise da resposta imune microglial (figura 13). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 apresentaram perfil semelhante, aumentando de forma significativa no grupo Hipóxia quando comparado aos grupos Controle (**A** $p = 0,0067$; **B** $p = 0,0041$) e Controle+minociclina (**A** $p = 0,0019$; **B** $p = 0,0015$). A citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou níveis elevados no grupo Hipóxia+minociclina quando comparado aos grupos controle ($p = 0,0070$) e Controle+minociclina ($p = 0,0039$).

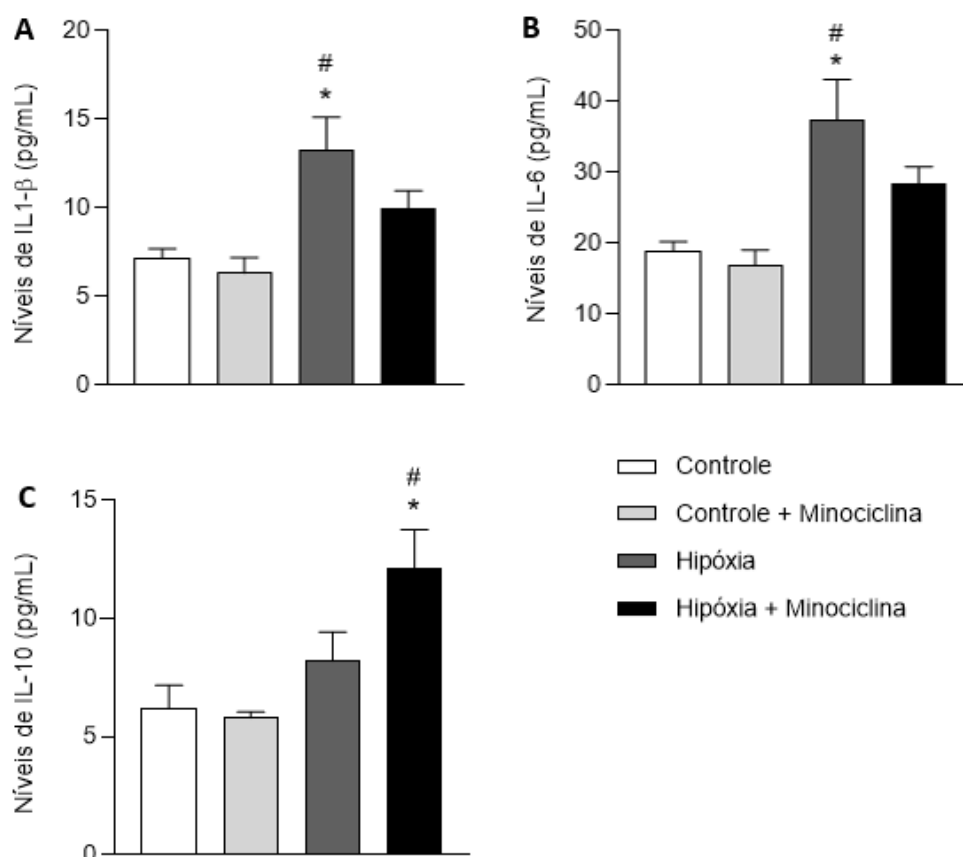


Figura 13: Efeito da minociclina *in vitro* sobre os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-10 em cultura de células de micróglia (BV-2) após o protocolo POG. Figura **A** representa o gráfico de níveis de IL-1 β ; Figura **B** representa o gráfico de níveis de IL-6 e Figura **C** representa o gráfico de níveis de IL-10. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle+minociclina. (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.7 TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE MINOCICLINA EM PEIXE-ZEBRA A PARTIR DA VIABILIDADE CELULAR

Como na literatura não foram encontradas concentrações padronizadas de minociclina em peixes-zebras adultos, foi necessário a realização de testes em diferentes concentrações. A análise quantitativa de TTC foi a técnica escolhida para avaliar a melhor concentração de minociclina, por ser um bom parâmetro para avaliação de viabilidade celular e toxicidade.

As quatro concentrações de minociclina: 1mg/L, 10mg/L, 50mg/L e 90mg/L, foram testadas em condições de hipóxia e normóxia (figura 14). O grupo Controle-hipóxia apresentou uma redução da conversão do TTC quando comparado ao grupo Controle-normóxia ($p=0,0113$). As quatro concentrações apresentaram bons resultados quando utilizadas em condições de normóxia,

mas na condição de hipóxia a concentrações de 1mg/L de minociclina teve maior destaque, conseguindo a melhor recuperação após hipóxia em peixe-zebra ($p=0,0027$), aumentando a viabilidade celular de forma semelhante a condições do controle. Sendo assim, a concentração de 1mg/L de minociclina foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

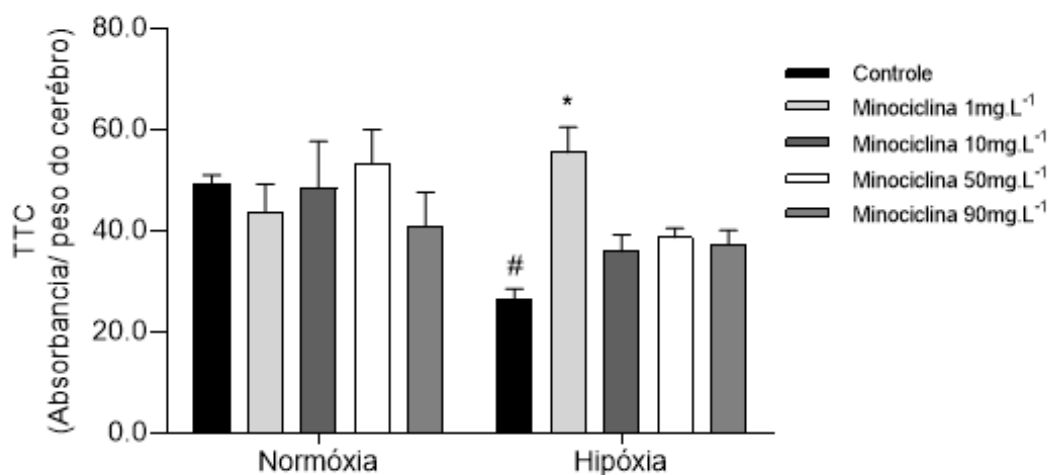


Figura 14: Efeito *in vivo* de diferentes concentrações de minociclina sobre a viabilidade celular em peixe-zebra após o protocolo de hipóxia. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos absorbância/peso do cérebro. * $p<0,05$ em comparação ao grupo controle da condição de Hipóxia. # $p<0,05$ em comparação ao grupo Normóxia. (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.7.1 Visualização da área isquêmica por coloração de TTC em peixe-zebra

A partir da coloração de fatias cerebrais de peixe-zebra utilizando o TTC, é possível observar a área isquêmica após protocolo de hipóxia. O grupo Controle apresenta coloração correspondente a células viáveis, assim como o grupo Controle+minociclina. O grupo Hipóxia apresenta a maior parte da fatia cerebral sem pigmentação, correspondente redução da viabilidade celular na porção afetada. No grupo Hipóxia+minociclina é possível observar a recuperação da coloração por TTC, assemelhando-se a imagem do Controle (figura 15).

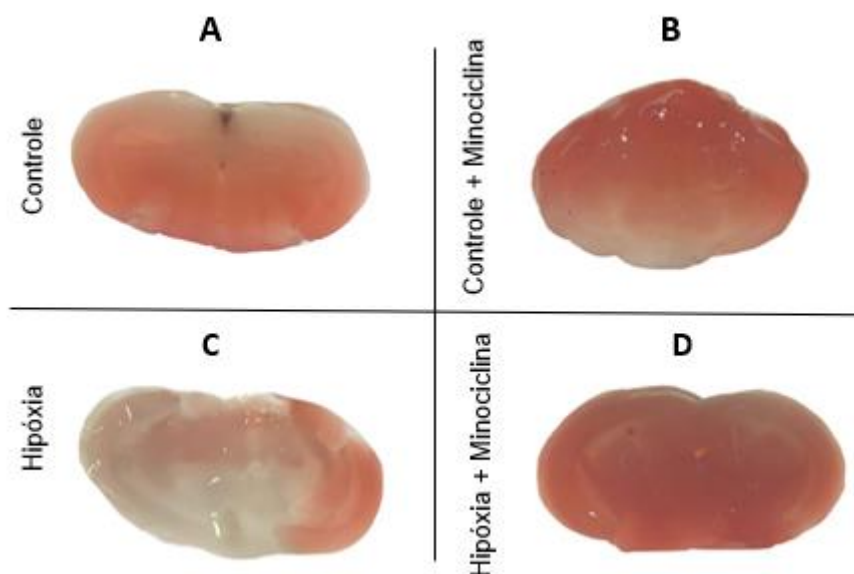


Figura 15: Efeito *in vivo* da minociclina sobre a área isquêmica em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia. Imagens representativas de fatias cerebrais de cada grupo. Figura **A** representa o grupo Controle; figura **B** representa o grupo Controle+minociclina; figura **C** representa o grupo Hipóxia e figura **D** representa o grupo Hipóxia+minociclina. Conforme o formazan produzido é possível observar diferentes colorações, a menor viabilidade celular é vinculada ao grupo Hipóxia por apresentar menor coloração. O grupo Hipóxia+minociclina traz visualmente o efeito positivo da minociclina perante uma melhor viabilidade celular após hipóxia.

4.8 NÍVEIS DE GLUTAMATO EM PEIXE-ZEBRA

Da mesma maneira do experimento *in vitro*, a análise de glutamato extracelular foi realizada por meio da reação de conversão do Glu em α -cetoglutarato, catalisada pela enzima GDH (figura 16). Os grupos Hipóxia ($p=0,0063$) e Hipóxia+minociclina ($p=0,0074$) apresentaram um aumento de glutamato significativo, em comparação com o grupo Controle.

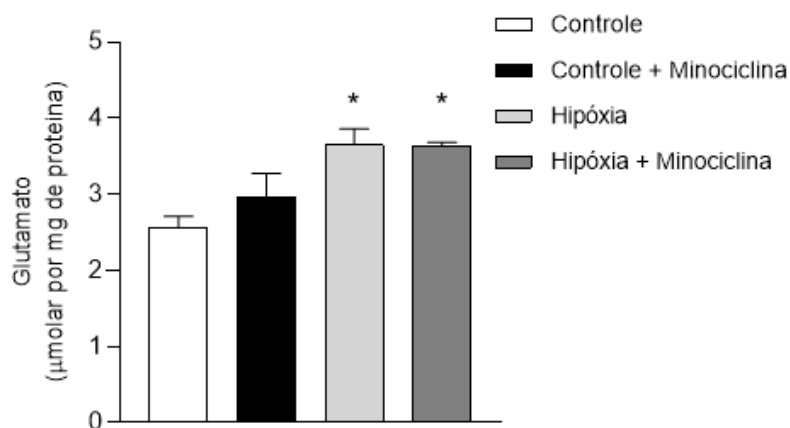


Figura 16: Efeito *in vivo* da minociclina sobre os níveis de glutamato em cérebro total de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os

valores estão expressos em nmol.mg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.9 AVALIAÇÃO DE PARAMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXE-ZEBRA

4.9.1 Oxidação de DCFH

A fim de verificar a formação de espécies reativas nos diferentes grupos, foi quantificado os níveis de oxidação de DCFH (figura 17). O grupo Hipóxia apresentou maior oxidação em comparação com o grupo Controle ($p = 0,0317$) e Controle+minociclina ($p = 0,0185$). Já o grupo Hipóxia+minociclina não apresentou diferença significativa em comparação aos demais grupos.

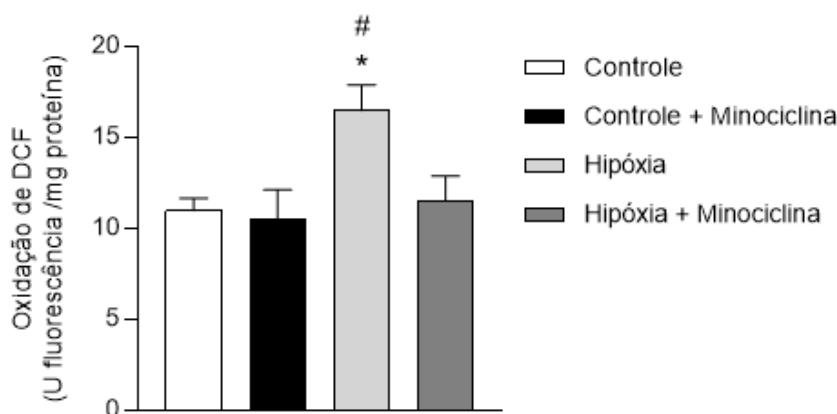


Figura 17: Efeito *in vivo* da minociclina sobre a oxidação de DCFH em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle+minociclina. (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.9.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica em tecido cerebral de peixe-zebra foi analisada pela técnica de TBARS (figura 18). O grupo Hipóxia apresentou maior oxidação em comparação com o grupo Controle ($p = 0,0096$) e Controle+minociclina ($p = 0,079$). O grupo Hipóxia+minociclina não foi capaz de reverter esse aumento na oxidação.

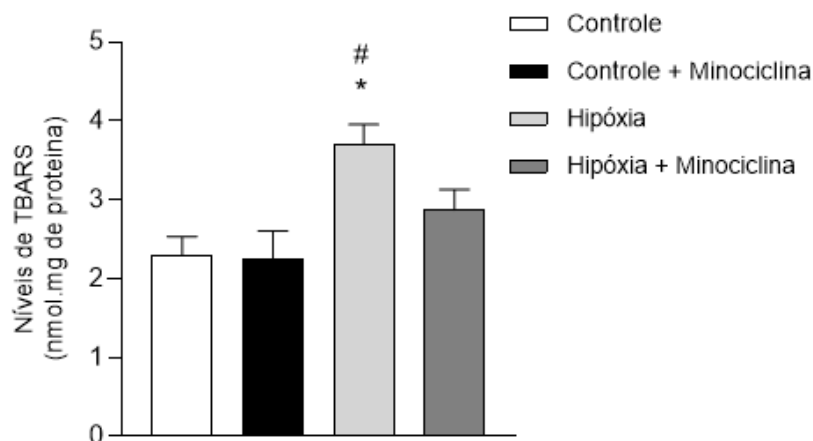


Figura 18: Efeito *in vivo* da minociclina sobre os níveis de TBARS em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle+minociclina. (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.9.3 Conteúdo de grupos sulfidríla

A análise do conteúdo de grupos sulfidríla não apresentou diferença significativa entre os grupos (figura 19).

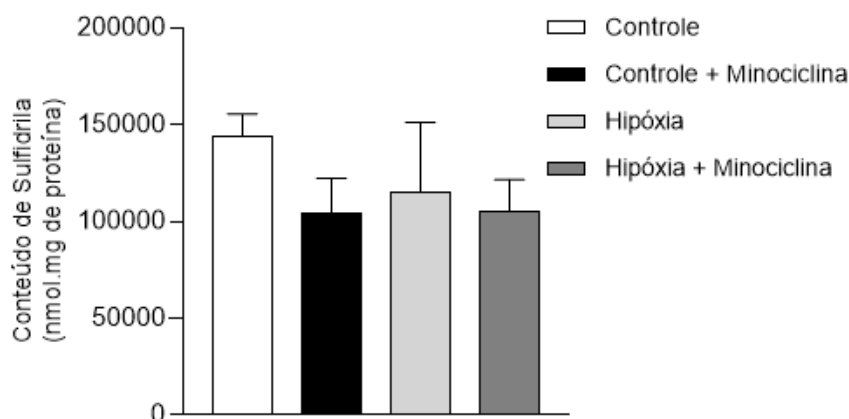


Figura 19: Efeito *in vivo* da minociclina sobre o conteúdo de sulfidrílas em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína. Não houve diferença significativa entre os grupos ao adotar $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.9.4 Atividade de enzimas antioxidantes

Foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas por meio da atividade de SOD e CAT. Ambas não apresentaram diferença significativa de atividade entre os grupos (figura 20).

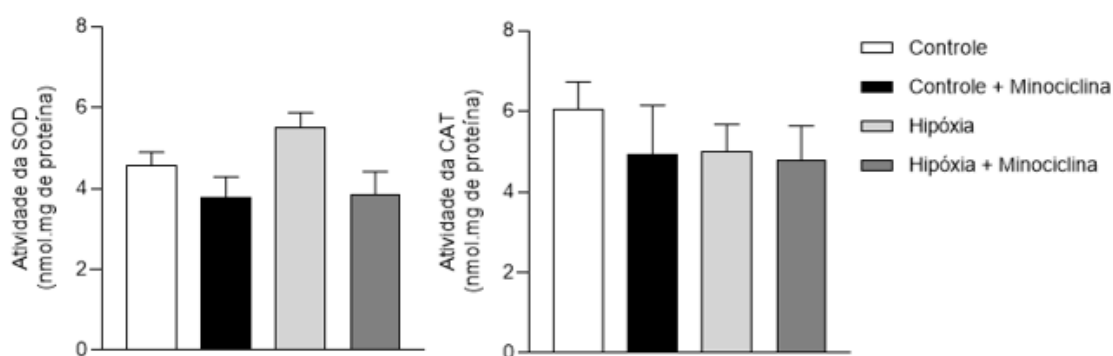


Figura 20: Efeito *in vivo* da minociclina sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em fatias cerebrais de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia. Figura A representa o gráfico da atividade de SOD; Figura B represente o gráfico de atividade de CAT. Os resultados representam média \pm erro padrão. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína. Não houve diferença significativa entre os grupos ao adotar $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.10 COMPORTAMENTO MOTOR DO PEIXE-ZEBRA

Complementando os achados bioquímicos, foi realizado o teste comportamental de *Novel Tank*, com intuito de avaliar a capacidade motora dos peixe-zebra após protocolo de hipóxia (figura 21). Avaliando a distância percorrida (A), o grupo Hipóxia apresentou uma redução comparado ao Controle ($p = 0,0155$), e o tratamento com minociclina foi capaz de reverter essa redução ($p = 0,047$). O número de cruzamentos também foi reduzido no grupo Hipóxia em comparação ao Controle ($p = 0,0054$), assim como o ângulo de giro absoluto ($p = 0,035$), ambos parâmetros foram revertidos no grupo Hipóxia+minociclina.

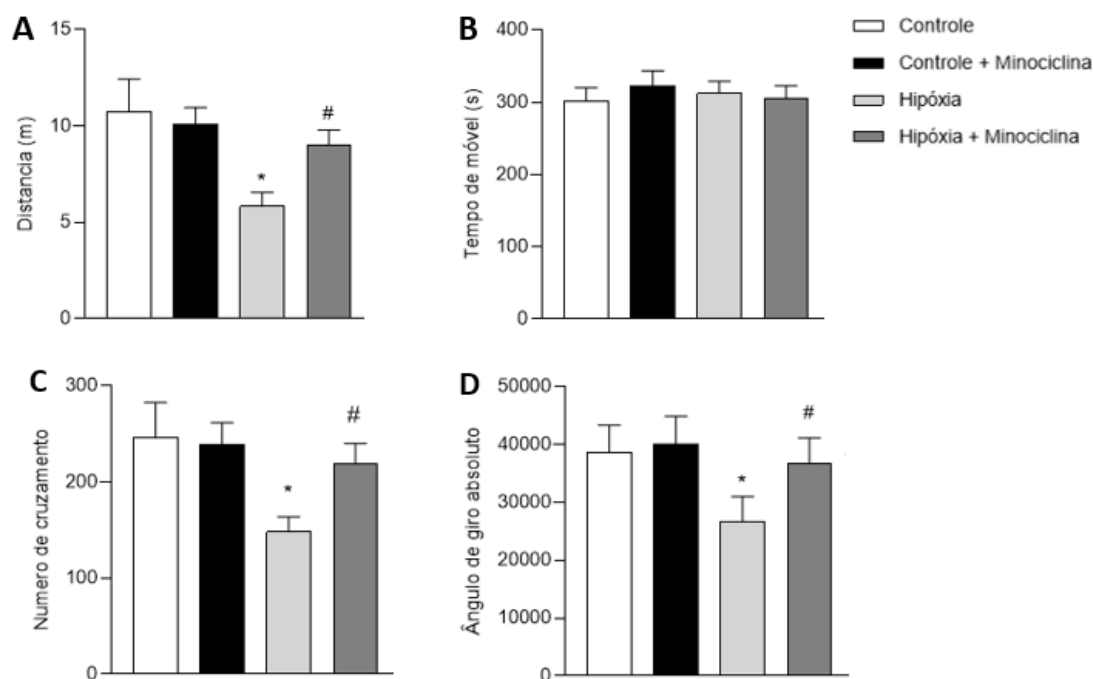


Figura 21: Efeito *in vivo* da minociclina sobre diferentes parâmetros motores de peixe-zebra após o protocolo de hipóxia. Gráfico A representa a distância percorrida (m); Gráfico B representa o tempo móvel (s); Gráfico C representa o número de cruzamentos e a Gráfico D representa o ângulo de giro absoluto. Os resultados representam média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Hipóxia. (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.10.1 Perfil locomotor em peixe-zebra após protocolo de hipóxia

O software Any-Maze proporciona o traço do nado de cada peixe de forma individual. Uma imagem representativa para cada grupo representa o perfil locomotor apresentado anteriormente no gráfico A: distância percorrida. É possível observar a redução de traços na imagem do grupo Hipóxia em comparação a imagem do Controle. Já o grupo Hipóxia+minociclina se assemelhou aos traços do grupo Controle (figura 22).

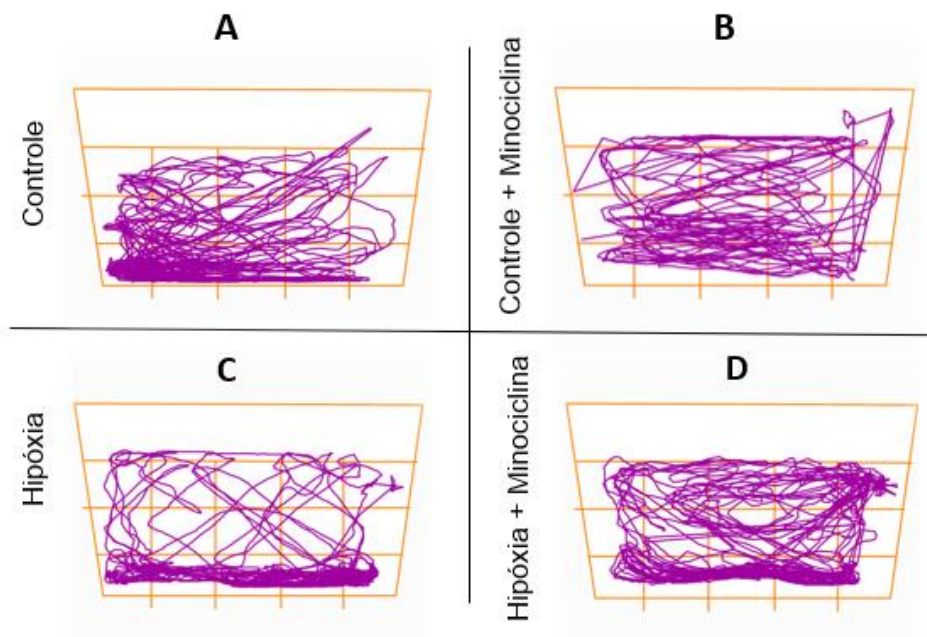


Figura 22: Efeito *in vivo* da minociclina na distância percorrida por peixe-zebra após o protocolo de hipóxia. Imagens representativas do traço do nado de cada grupo. Figura **A** representa o grupo Controle; figura **B** representa o grupo Controle+minociclina; figura **C** representa o grupo Hipóxia e figura **D** representa o grupo Hipóxia+minociclina.

5. DISCUSSÃO

Episódios de isquemia cerebral, principalmente o AVC, afetam um grande número de pessoas anualmente, e apresentam grandes índices de mortalidade (Feigin et al., 2018). Além disto, estes episódios são capazes de causar diversas sequelas em sobreviventes, e dependendo da gravidade podem incapacitar o indivíduo ao longo da vida (Johnson et al., 2019). Mesmo que seja uma patologia de grande incidência para a população, seu tratamento padrão é considerado limitado, pois não auxilia na resolução da neuroinflamação resultante da lesão I/R (Piccardi et al., 2018). Sendo assim, as isquemias cerebrais são foco de diversas pesquisas, que visam principalmente agir sob a neuroinflamação. O presente estudo analisou em modelo experimental *in vitro* e *in vivo*, a ação aguda da minociclina, fármaco que já é descrito na literatura como um potencial tratamento para a neuroinflamação decorrente de episódios isquêmicos, além de outras doenças que compartilham dessa fisiopatologia (Naderi et al., 2020).

O estudo partiu do modelo mais básico, utilizando células BV-2 de micróglia com a estratégia importante de analisar os efeitos diretos do fármaco na linhagem celular. A escolha desse tipo celular é devido a micróglia ser uma célula residente do SNC que tem grande destaque perante lesões neuroinflamatórias (Karve et al., 2016). Nas lesões isquêmicas cerebrais, essa célula é descrita na literatura como peça chave do início da cascata inflamatória, e sua importância se deve principalmente pela alteração de fenótipo que ocorre a partir do estímulo (Gaire, 2021). A micróglia quando ativada em seu fenótipo M1 apresenta características pró-inflamatórias e conseqüentemente, colabora para o aumento da lesão (Franco et al., 2012). Já o fenótipo M2 quando ativado, a micróglia é caracterizada por ser anti-inflamatória, com importante papel para neurogênese do tecido lesado (Neumann et al., 2006).

Para mimetizar a fisiopatologia da lesão I/R *in vitro*, o presente estudo utilizou o protocolo POG, padronizado por Goldberg e Choi (1993), em que as células são mantidas na condição de privação de oxigênio e glicose, e em seguida voltam as condições padrões, se igualando a reperfusão após o episódio isquêmico. Para a avaliação da resposta aguda da lesão, após 24h todos os

grupos passaram pelo teste de MTT. O teste quantifica a viabilidade celular por meio da atividade de desidrogenases, e consequente formação de formazan por mitocôndria saudáveis (Andrighetti-Fröhner et al., 2003). O grupo Hipóxia apresentou resultados de baixa viabilidade celular, quando comparado aos grupos Controle, se assemelhando aos achados de Goldberg e Choi (1993), e também corroborando aos achados de Xiang et al (2014), que ao reproduzir o modelo POG em BV-2, obteve redução significativa do MTT no grupo Hipóxia comparado com o Controle.

A redução da viabilidade celular após o protocolo POG foi minimizada para o grupo tratado com minociclina, o fármaco tem como uma de suas ações a proteção mitocondrial (Yong et al., 2004). A minociclina tem ação anti-apoptótica relacionada a mitocôndria, inibindo a liberação do citocromo C. Além disso, essa molécula tem demonstrado exercer proteção mitocondrial regulando o equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl-2. (Zhu et al., 2002; Teng et al., 2004; Wang et al., 2004). Em modelo de estresse por fadiga crônica em roedores, a minociclina foi capaz de restaurar significativamente a atividade das enzimas dos complexos mitocondriais (I, II e IV) e o estado redox mitocondrial (Kumar et al, 2012). Com os resultados obtidos pelo teste de MTT no presente estudo, é possível sugerir que o efeito agudo neuroprotetor da minociclina tem importante correlação com a ação protetora sobre a mitocôndria.

Além de diminuir a viabilidade celular, os efeitos celulares do protocolo POG também se mostraram visuais, através da diferença de morfologia da micróglia após hipóxia. As micróglia são células residentes do SNC, que em repouso apresentam ramificações características, e quando ativadas assumem uma morfologia amebóide (Färber e Kettenmann, 2005). Após o protocolo POG, a micróglia assumiu características de uma célula ativada, condizente com a fisiopatologia de isquemias cerebrais (Gaire, 2021). Esta mudança morfológica de perfil amebóide também foi descrita por Suk (2004), ao reproduzir o protocolo POG em células BV-2.

Para confirmar a ativação microglial visualizada em microscópio após protocolo POG, foi realizada a técnica de imunofluorescência, utilizando o marcador IBA-1. Esse anticorpo é amplamente utilizado para marcar micróglia

ativas, porém sem diferenciar os fenótipos M1 e M2 (Ito et al., 1998). Os resultados apresentados confirmaram a visualização microscópica de ativação microglial, já que o grupo Hipóxia apresentou aumento significativo da corção DAP/IBA-1. Este resultado também corresponde aos acontecimentos fisiopatológicos da lesão cerebral isquêmica descritos na literatura (Gaire, 2021).

Quando comparado com o grupo Hipóxia, o grupo Hipóxia+minociclina apresentou uma redução na marcação de IBA-1. Esse acontecimento está ligado a um dos mecanismos neuroprotetores mais descritos da minociclina, na qual a inibição da ativação microglial conseqüentemente é capaz de promover a diminuição da liberação de mediadores pró-inflamatórios danosos (Garrido-Mesa et al., 2013) Estudos indicam que esta inibição está fortemente ligada ao fenótipo M1, já que o fármaco atenua a indução da expressão dos marcadores do mesmo (Kobayashi et al., 2013) além de induzir o fenótipo M2 (Michels et al., 2015). Os resultados apresentados no presente estudo corroboram com os achados da literatura, apontando que uma única concentração de minociclina foi capaz de reduzir a ativação microglial 24 horas após o insulto isquêmico (Yang et al., 2015).

Considerando que os fenótipos microgliais M1 e M2 são caracterizados por citocinas específicas, o presente estudo avaliou os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e da citocina anti-inflamatória IL-10. A IL-1 β e IL-6 apresentaram perfil de expressão semelhante, com aumento significativo no grupo Hipóxia, quando comparado ao Controle. Essas citocinas são associadas ao fenótipo microglial M1, por terem características pró-inflamatórias apresentando níveis elevados principalmente na fase aguda (Kanazawa et al., 2017). Em ambas as citocinas pró-inflamatórias, o grupo tratado com minociclina não foi capaz de reverter o aumento de forma significativa. Mesmo que a redução dos níveis de IL-1 β e IL-6 seja uma característica já citada da minociclina, as metodologias de pesquisas se diferem (Naderi et al., 2020). Estudos *in vitro* que adotaram protocolo POG e conseguiram reduzir o nível de citocinas inflamatórias utilizando a minociclina, avaliaram a ação do fármaco em diferentes condições de incubação (tempo/concentração), e realizaram mais de uma administração do mesmo, algumas metodologias até realizaram um pré-tratamento com minociclina antes

de induzir o POG (Suk, 2004; Rueger et al., 2012; Lu; et al., 2016). É importante ressaltar que novos estudos, em diferentes contextos de exposição da minociclina ainda são necessários para maior entendimento do mecanismo de ação deste fármaco *in vitro*. Além do mais, não podemos descartar que outras citocinas e vias inflamatórias estejam envolvidas no processo de insulto celular induzido por POG e na neuroproteção do fármaco.

Em contrapartida, a citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou um aumento significativo dos seus níveis no grupo Hipóxia+minociclina quando comparado ao grupo Controle e ao Controle+minociclina. Tais achados remetem que a minociclina pode estar apresentando um possível papel anti-inflamatório, com sinergismo entre o ambiente de privação de oxigênio e glicose e a ação do fármaco. A via da IL-10 pode ser crucial para entendimento da neuroproteção causada pelo fármaco, além do estudo de outros marcadores anti-inflamatórios e neurotróficos. Na literatura, em modelo de isquemia cerebral em roedores, Yang e colaboradores (2015), apresentaram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, com níveis elevados de IL-10 utilizando apenas uma dose de minociclina, o que reforça a importância desta via. Além disso, a minociclina está associada com a supressão do fenótipo M1 e favorecimento do fenótipo M2, que está ligado a liberação dessa citocina anti-inflamatória (Michels et al., 2015).

As análises realizadas exclusivamente no modelo *in vitro* possibilitaram resultados interessantes a respeito da ligação direta da micróglia com os efeitos terapêuticos da minociclina, e que seriam inviáveis de reproduzir diante da complexidade do organismo vivo. Porém o modelo em cultura de células também apresenta limitações, principalmente em doenças que apresentam uma fisiopatologia de grande complexidade, como as isquemias cerebrais, dificultando a reprodução de todos os parâmetros descritos *in vivo*, no modelo *in vitro*. É necessário levar em consideração vários fatores, como a ausência da BHE, do fluxo sanguíneo, da infiltração imune periférica, do conjunto celular do SNC, a impossibilidade de avaliar comportamento e sequelas, entre outros (Sommer, 2017).

Devido à complexidade dos acontecimentos da lesão I/R, foi adotado o modelo experimental *in vivo* utilizando peixe-zebra. Diferente dos estudos de

isquemias em roedores que já são bem estabelecidos na literatura (Naderi et al., 2020), o peixe-zebra começa a surgir como uma alternativa para modelos experimentais de lesão de I/R cerebral (Chen et al., 2021). Além das vantagens financeiras e de manipulação deste modelo animal (Walcott e Peterson, 2014), o protocolo de hipóxia cerebral em peixe-zebra é de fácil execução e capaz de reproduzir os danos cerebrais e motores característicos da fisiopatologia da doença (Yu e Yang, 2011; Braga et al., 2013).

Diferente do experimento *in vitro*, em que as análises foram realizadas no tempo de 24 horas após protocolo POG, no modelo de peixe-zebra o tempo foi reduzido para 1 hora após protocolo de hipóxia. Braga e colaboradores (2013), definiram com seus resultados que os danos causados após o protocolo de hipóxia perduraram apenas nas primeiras horas. Isso se explica, devido ao peixe-zebra pertencer à família *Cyprinidae*, conhecidos por serem tolerantes à baixas concentrações de O₂, apresentando capacidades adaptativas como aumento da área da superfície da brânquia e expressão aprimorada da mioglobina, transportador de oxigênio (Roesner et al., 2006; Xu; Yang et al., 2011). Porém de forma aguda, o modelo em peixe-zebra é confiável e reprodutível para uso no estudo de danos cerebrais isquêmicos (Braga et al., 2013).

Para avaliar os efeitos da minociclina após protocolo de hipóxia em peixe-zebra, foi necessária a padronização da concentração do fármaco utilizado. Na literatura não existem referências indicando doses, tempo e administração de minociclina em peixes-zebra adultos, tampouco investigações voltadas aos seus possíveis efeitos neuroprotetores. Para chegar na concentração ideal do fármaco, foi adotada a análise quantitativa de TTC em 4 diferentes doses: 90mg/L, 50mg/L, 10mg/L e 1mg/L. Todas foram testadas em um grupo de condição normóxia e um grupo que passou pelo protocolo de hipóxia. A análise de TTC permite avaliar a formação de formazan por mitocôndrias saudáveis, se tornando um bom indicador de viabilidade celular e toxicidade farmacológica (Preston e Webster, 2000), assim como a técnica de MTT *in vitro*.

As quatro concentrações apresentaram resultados semelhantes ao controle em condições de normóxia, mas na condição de hipóxia a dose de

1mg/L de minociclina teve maior destaque. Resultando na melhor recuperação após lesão I/R em peixe-zebra, sendo capaz de aumentar a viabilidade celular de forma semelhante a condições do controle, e por isso foi escolhida como a concentração ideal de minociclina para o presente estudo.

A análise quantitativa de TTC no grupo Hipóxia revelou a lesão cerebral resultante do protocolo, apresentando atividade reduzida em comparação ao Controle. Este resultado se assemelha aos de Braga e colaboradores (2013), no tempo de 1 hora após protocolo de hipóxia. Além da análise quantitativa, foi realizada a técnica de coloração de TTC, que possibilitou a visualização deste marcador de viabilidade celular em fatias cerebrais de peixe-zebra. O grupo Hipóxia expressou resultado condizente para análise quantitativa de TTC, apresentando uma importante área da fatia cerebral sem coloração. Em contraste, o controle apresentou coloração em todas as áreas do cérebro. Yu e Yang (2011), obtiveram resultados semelhantes ao padronizar o protocolo de hipóxia, apontando que 30 minutos após o episódio isquêmico, a fatia do cérebro do peixe-zebra praticamente não apresentava coloração por TTC.

O grupo Hipóxia tratado com a minociclina de 1mg/L foi capaz de se igualar ao Controle, apresentando fatias cerebrais pigmentadas pela formação de formazan, e conseqüentemente recuperando a viabilidade mitocondrial. Estes resultados fortalecem os dados encontrados *in vitro* pela análise de MTT, reforçando o papel protetor importante da minociclina sobre a mitocôndria, e sua grande influência perante a área isquêmica atingida.

Em modelos de isquemia cerebral em roedores, diversos estudos utilizando minociclina demonstraram a reversão da área isquêmica por coloração de TTC (Koistinaho et al., 2005; Franco et al., 2012; Cardoso et al., 2013). Entre estes, se destaca o estudo de Yang e colaboradores (2015), por apresentar a reversão do dano I/R também de forma aguda, e com uma única dose de minociclina em roedores. Sendo assim, o modelo alternativo utilizando protocolo de hipóxia em peixe-zebra reforça as evidências descritas na literatura da ação da minociclina perante lesões I/R. A reprodutibilidade do resultado também traz segurança para a adesão do modelo em outras pesquisas envolvendo lesão I/R cerebral.

Além dos danos celulares e da ativação imune descritos anteriormente, episódios de isquemias cerebrais se caracterizam por apresentarem excitotoxicidade glutamatérgica (Campbell et al., 2019). No presente estudo foi analisado os níveis de glutamato nos dois modelos propostos. De forma aguda, o glutamato apresentou níveis elevados no grupo Hipóxia de ambos os modelos experimentais, quando comparado ao Controle. Porém, o tratamento com minociclina não foi capaz de reverter esse aumento em nenhum dos modelos, mesmo que esse fármaco já tenha sido associado a capacidade de reduzir a excitotoxicidade do glutamato, e também diminuir morte neuronal induzida por toxicidade glutamatérgica (Garrido-Mesa et al., 2013; Gonzalez et al., 2007; Noble et al., 2009). Possivelmente o efeito da minociclina sob o neurotransmissor glutamato está relacionado a outras especificidades de tratamento, o que impossibilitou a percepção em concentração única e de forma aguda. Além disso, somente um parâmetro da expressão de glutamato foi analisado no presente estudo, não descartando a realização de outras metodologias que complementariam o entendimento da ação aguda da minociclina sobre o neurotransmissor.

Uma das consequências do dano mitocondrial e da excitotoxicidade glutamatérgica é a superprodução de radicais livres de oxigênio, que leva ao estresse oxidativo na região afetada pela isquemia. Através de danos no DNA, peroxidação lipídica, alteração da estrutura e função das proteínas, o estresse oxidativo causa lesão e morte de neurônios e células residentes do SNC na região isquêmica (Ceulemans et al., 2010; Campbell et al., 2019). Alguns parâmetros avaliativos do dano oxidativo foram realizados pelo presente estudo, nos dois modelos experimentais propostos. A oxidação de DCFH dependente de espécies reativas é um indicador de dano muito utilizado, e se mostrou elevado nos grupos Hipóxia quando comparados ao Controle. Apenas na linhagem BV-2, o grupo Hipóxia+minociclina foi capaz de reverter esse aumento de forma significativa. Na peroxidação lipídica avaliada pela técnica de TBARS, o grupo Hipóxia em modelo de peixe-zebra apresentou níveis elevados deste marcador quando comparado aos Controles. Os danos oxidativos apresentados após lesão de I/R correspondem a excitotoxicidade glutamatérgica observada no grupo Hipóxia em ambos os modelos experimentais.

No presente estudo, o conteúdo de sulfidrilas e a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD foram analisadas, entretanto não apontaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Apenas na análise da oxidação de DCFH a minociclina se mostrou capaz de reverter o aumento causado pelo protocolo POG. Na literatura, já é descrito que o fármaco possui propriedades sequestrantes de radicais, devido à presença de anel fenólico em sua estrutura, agindo sobre radicais de oxigênio livre, incluindo ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio sob condições de estresse oxidativo (Dai et al., 2017).

A fim de complementar as análises bioquímicas, a ação da minociclina pós protocolo de hipóxia foi avaliada pelo teste comportamental *novel tank* em peixe-zebra, com foco principal em parâmetros motores. Sabe-se que pacientes que passam por episódios isquêmicos cerebrais, como no AVC, podem apresentar sequelas motoras agudas de diversas maneiras, dependendo da intensidade e da região cerebral atingida (Fure et al., 2006). O modelo de hipóxia em peixe-zebra também apresenta sequelas motoras, porém apenas nos primeiros momentos após retornarem à condição de normóxia. Braga e colaboradores (2013), mostraram uma redução da distância percorrida e nos ângulos de giro causada por hipóxia apenas em animais submetidos a 1h de recuperação. Estes dados foram reproduzidos pelo presente estudo, ao adotar o tempo de 1h de recuperação após protocolo de hipóxia, caracterizando os déficits motores apresentados nas primeiras horas por sobreviventes de episódios isquêmicos.

O grupo Hipóxia+minociclina foi capaz de reverter o comportamento motor apresentado pelo grupo Hipóxia. Sugerindo que a administração única de minociclina, ainda na primeira hora após protocolo de hipóxia tem potencial protetor contra os danos motores causados pela lesão I/R. Estes resultados positivos encontrados no teste comportamental, indicam a possibilidade de estarem interligados com os efeitos neuroprotetores agudos da minociclina observados no presente estudo, que resultaram em menor dano ao SNC e teoricamente menores sequelas. Estes resultados corroboram com achados de estudos em roedores, em que a minociclina também foi capaz de melhorar

parâmetros comportamentais e cognitivos após indução de lesão I/R (Tao et al., 2015; Yew et al., 2019; Wang et al., 2020).

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a padronização dos modelos de hipóxia *in vitro* e *in vivo* foi eficaz, alcançando os parâmetros esperados após uma lesão de I/R, causando estresse oxidativo, diminuição da viabilidade celular, aumentando os níveis de glutamato e ocasionando a ativação microglial com aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Tais resultados fortalecem as vantagens dos modelos alternativos propostos para estudos de doenças isquêmicas.

O tratamento com a minociclina em dose única foi capaz de reverter os danos causados sob a viabilidade celular para os grupos submetidos ao protocolo de hipóxia em ambos os modelos. Também foi capaz de reduzir a ativação microglial *in vitro*, e melhorar parâmetros comportamentais *in vivo*. Sugerindo que a administração da minociclina, ainda na primeira hora após episódio de hipóxia cerebral, é capaz de diminuir sequelas motoras, e que este efeito protetor está possivelmente relacionado a proteção mitocondrial e ao aumento de viabilidade celular, além da modulação da ativação microglial ocasionada pelo fármaco.

7. REFERÊNCIAS

- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992; 13(3): 637-648.
- Andrighetti-Fröhner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CMO. "Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98(6): 843-848.
- Antonic A, Sena ES, Donnan GA, Howells DW. Human in vitro models of ischaemic stroke: a test bed for translation. *Translational stroke research*. 2012; 3(3): 306-309.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD, *Methods Biochem.*[25] J." Lan, DH Jiang, Desferrioxamine and vitamin E protect against Anal. 1987: 32: 279-312.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome research*. 2000; 10(9): 1351-1358.
- Behra M, CousiN X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, Strähle U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature neuroscience*. 2002; 5(2): 111-118.
- Belov Kirdajova D, Kriska J, Tureckova J, Anderova M. Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2020; (14): 51.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn*. 2004; 230:481-493.
- Braga MM, Rico EP, Córdova SD, Pinto CB, Blaser RE, Dias RD, Souza DO. Evaluation of spontaneous recovery of behavioral and brain injury profiles in zebrafish after hypoxia. *Behavioural brain research*. 2013; 253: 145-151.

- Bye N, Habgood M, Callaway JK, Malakooti N, Potter A, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. 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 BC, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, Donnan GA. Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019; 5(1): 1-22.
- 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.
- Ceulemans AG, Zgavc T, Kooijman R, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Michotte Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *Journal of neuroinflammation*. 2010; 7(1): 1-18.
- Chen Y, Cai Z, Ke Z. Antineuroinflammation of minocycline in stroke. *The neurologist* 2017; 22(4): 120-126.
- Chen W, Xie L, Yu F, Li Y, Chen C, Xie W, Li P. Zebrafish as a model for in-depth mechanistic study for stroke. *Translational Stroke Research*. 2021; 12(5) 695-710.
- Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual review of neuroscience*. 1990; 13(1): 171-182.
- 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): 305-309.
- da Silveira M, Yoshida WB. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. *Jornal vascular brasileiro*. 2019; 3(4): 367-378.

- Dai C, Ciccotosto GD, Cappai R, Wang Y, Tang S, Xiao X, Velkov T. Minocycline attenuates colistin-induced neurotoxicity via suppression of apoptosis, mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017; 72(6): 1635-1645.
- Dirnagl U, Iadecola, C, Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*. 1999; 22(9): 391-397.
- Edwards JG, Michel WC. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 2002; 454:294-309.
- Eltzschig HK, Eckle, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature medicine*. 2011; 17(11); 1391-1401.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186:407-21.
- Fang M, Yuan Y, Lu J, Li HE, Zhao M, Ling EA, Wu CY. Scutellarin promotes microglia-mediated astrogliosis coupled with improved behavioral function in cerebral ischemia. *Neurochemistry international*. 2016; 97: 154-171.
- Färber K, Helmut K. Physiology of microglial cells. *Brain research reviews* 2005; 48(2): 133-143.
- Feigin VL, Nguyen G, Cercy K. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016. *N Engl J Med*. 2018; 379: 2429–37.
- Ferrer-Acosta Y, Gonzalez-Vega MN, Rivera-Aponte DE, Martinez-Jimenez S M, Martins AH. Monitoring astrocyte reactivity and proliferation in vitro under ischemic-like conditions. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2017; 128: e55108.
- Franco EC, Cardoso MM, Gouvêia A, Pereira A, Gomes-Leal W. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. *Neuroscience research*, 2012; 73(2): 122-132.
- Fu C, Zhang X, Lu Y, Wang F, Xu Z, Liu S, Liu X. Geniposide inhibits NLRP3 inflammasome activation via autophagy in BV-2 microglial cells exposed to

oxygen–glucose deprivation/reoxygenation. *International immunopharmacology*. 2020; 84: 106547.

Fure B, Bruun WT, Engedal K, Thommessen B. Cognitive impairments in acute lacunar stroke. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2006; 114(1): 17-22.

Gaire, BP. "Microglia as the Critical Regulators of Neuroprotection and Functional Recovery in Cerebral Ischemia." *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2021; 1-21.

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

Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. What is behind the non-antibiotic properties of minocycline?. *Pharmacological research*. 2013; 67(1): 18-30.

Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *Journal of neuroscience*. 1993; 13 (8): 3510-3524.

González JC, Egea J, Del Carmen Godino M, Fernandez-Gomez FJ, Sánchez-Prieto J, Gandía L, Hernández-Guijo JM. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca²⁺ signalling in hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience* 2007; 26(9): 2481-2495.

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.

Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurologic clinics*. 2006; 24(1): 1-21.

Heo K, Cho YJ, Cho KJ, Kim HW, Kim HJ, Shin HY, Kim GW. 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.

Holloway PM, Gavins FN. Modeling ischemic stroke in vitro: status quo and future perspectives. *Stroke*. 2016; 47(2): 561-569.

- Hoste EA, Kellum JA, Selby NM, Zarbock A, Palevsky PM, Bagshaw SM, Chawla LS. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2018; 14(10): 607-625.
- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2012; 43 (11); 3063-3070.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular brain research*. 1998; 57(1): 1-9.
- Jiang CT, Wu WF, Deng YH, Ge JW. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke. *Molecular medicine reports* 2020; 21(5): 2006-2018.
- Johnson CO, Nguyen M, Roth GA, Nichols E, Alam T, Abate D, Miller TR. Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. 2019; 18(5): 439-458.
- Jurisch-Yaksi N, Yaksi E, Kizil C. Radial glia in the zebrafish brain: Functional, structural, and physiological comparison with the mammalian glia. *Glia*. 2020; 68(12): 2451-2470.
- Kamel H, Iadecola C. Brain-immune interactions and ischemic stroke: clinical implications. *Archives of neurology* 2012; 69(5): 576-581.
- Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18(10): 21-35.
- Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British journal of pharmacology*. 2016; 173(4): 692-702.
- Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*. 2001; 440:342-377.

- Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett*. 2004; 355:29-32.
- Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, kadomatsu K. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell death & disease*. 2013; 4(3): e525-e525.
- Koistinaho M, Malm TM, Kettunen MI, Goldsteins G, Starckx S, Kauppinen RA, Koistinaho J. Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloprotease-9-deficient mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2005; 25(4): 460-467.
- Kumar A, Vashist A, Kumar P, Kalonia H, Mishra J. Potential role of licofelone, minocycline and their combination against chronic fatigue stress induced behavioral, biochemical and mitochondrial alterations in mice. *Pharmacol Rep* 2012; 64:1105-15
- Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in neurobiology*. 2014; (115): 157-188.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951;193: 265-275.
- Lu Y, Xiao G, Luo W. Minocycline suppresses NLRP3 inflammasome activation in experimental ischemic Stroke. *Neuroimmunomodulation*. 2016; 23(4): 230-238.
- Malhotra K, Chang JJ, Khunger A, Blacker D, Switzer JA, Goyal N, Tsivgoulis G. Minocycline for acute stroke treatment: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of neurology*. 2018; 265(8): 1871-1879.
- Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, Xu L, Maki M, Yu G, Borlongan CV. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. *BMC Neuroscience*. 2009; 10(1):126.

Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, Dal-Pizzol F. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain, behavior, and immunity* 2015; 43: 54-59.

Milan DJ, Peterson TA, Ruskin JN, Peterson RT, MacRae CA. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation*. 2003; 107(10): 1355-1358.

Mizuma A, Midori A, Yenari. Anti-inflammatory targets for the treatment of reperfusion injury in stroke. *Frontiers in neurology*. 2017. (8): 467.

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.

Morrison HW, Filosa JA. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *Journal of neuroinflammation*. 2013; 10(1): 1-20.

Naderi Y, Panahi Y, Barreto GE, Sahebkar A. Neuroprotective effects of minocycline on focal cerebral ischemia injury: a systematic review. *Neural Regeneration Research*. 2020; 15(5): 773.

Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *The FASEB journal* 2006; 20(6): 714-716.

Ngan AK, Wang YS. Tissue-specific transcriptional regulation of monocarboxylate transporters (MCTs) during short-term hypoxia in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2009; 154(4): 396-405.

Noble W, Garwood C, Stephenson J, Kinsey AM, Hanger DP, Anderton BH. Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*. 2009; 23(3): 739-750.

Oliveira GMM, Brant, LCC, Polanczyk CA, Biolo A, Nascimento BR, Malta DC, Ribeiro ALP. Estatística Cardiovascular–Brasil 2020. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2020; 115(3): 308-439.

Peskine, Anne, et al. "Neurological sequelae after cerebral anoxia." *Brain injury*. 2010; 24 (5): 755-761.

Piccardi B, Rosso C, Picq C, Caron E, Pradat-Diehl P. Reperfusion Injury after ischemic Stroke Study (RISKS): single-centre (Florence, Italy), prospective observational protocol study. *BMJ open*. 2018; 8(5): e021183.

Preston E, Webster J. Spectrophotometric measurement of experimental brain injury. *Journal of neuroscience methods*. 2000; 94(2): 187-192.

Radak D, Katsiki N, Resanovic I, Jovanovic A, Sudar-Milovanovic E, Zafirovic S, Isenovic E. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke. *Current vascular pharmacology*. 2017; 15(2): 115-122.

Ribeiro ME, Yoshida WB. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2019; 4(2): 183-194.

Rico EP, de Oliveira DL, Rosemberg DB, Mussulini BH, Bonan CD, Dias RD, Wofchuk S, Souza SDO, Bogo MR. Expression and functional analysis of Na(+)- dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain Res Bull*. 2010; 81:517–523.

Roesner A, Hankeln T, Burmester T. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology*. 2006; 209(11): 2129-2137.

Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BHM, Piatto ÂL, Calcagnotto ME, Bonan CD, Oliveira DL. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PloS one*. 20116; (5): e19397.

Rueger MA, Muesken S, Walberer M, Jantzen SU, Schnakenburg K, Backes H, Schroeter M. Effects of minocycline on endogenous neural stem cells after experimental stroke. *Neuroscience*. 2012; 215; 174-183.

Sanganalmath SK, Gopal P, Parker JR, Downs RK, Parker JC, Dawn B. Global cerebral ischemia due to circulatory arrest: insights into cellular pathophysiology

and diagnostic modalities. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017; 426(1): 111-127.

Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*. 2017; 133(2): 245-261.

Stern HM, Zon LI. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3(7): 533-539.

Suk K. Minocycline suppresses hypoxic activation of rodent microglia in culture. *Neuroscience letters*. 2004; 366(2): 167-171.

T Neumann J, Cohan HC, Dave RK, Wright BC, Perez-Pinzon AM. Global cerebral ischemia: synaptic and cognitive dysfunction. *Current drug targets*. 2013; 14(1): 20-35.

Tao T, Qin WY, Li ZX, Li XG. Effects of Minocycline on the Neuronal Plasticity in Rats after Focal Cerebral Ischemia Reperfusion Injury. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2015; 46(4): 524-531.

Teng YD, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S, Friedlander RM. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 10(9): 3071-3076.

UpToDate. Minocycline (systemic): Drug information. Lexi-Comp Online, 2021. Disponível em: https://www.uptodate.com/contents/minocycline-systemicdrug-information?topicRef=9653&source=see_link. Acesso 24 mar. 2021.

Vascotto SG, Beckham Y, Gregory MK. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemistry and cell biology*. 1997; 75(5): 479-485.

Veldman MB, Lin S. Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. *Pediatric research*. 2008; 64(5): 470-476.

Walcott BP, Peterson RT. Zebrafish models of cerebrovascular disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014; 34(4): 571-577.

- Wang J, Wei Q, Wang CY, Hill WD, Hess DC, Dong Z. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(19): 19948-19954.
- Wang S, Wang C, Wang L, Cai Z. Minocycline Inhibits mTOR Signaling Activation and Alleviates Behavioral Deficits in the Wistar Rats with Acute Ischemia stroke. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2020;19(10):791-799.
- 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.
- Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, Li CJ. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018; 46(4): 1650-1667.
- Xiang HF, Cao DH, Yang YQ, Wang HQ, Zhu LJ, Ruan BH, Wang MC. Isoflurane protects against injury caused by deprivation of oxygen and glucose in microglia through regulation of the Toll-like receptor 4 pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014; 54(4): 664-670.
- Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Strähle U. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology*. 2009; 28(2): 245-253.
- Yang Y, Salayandia VM, Thompson JF, Yang LY, Estrada EY, Yang Y. Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood–brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery. *Journal of neuroinflammation*. 2015; 12(1): 1-15.
- Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics*. 2010; 7(4): 378-391.
- Yew WP, Djukic ND, Jayaseelan JSP, Walker FR, Roos KAA, Chataway TK, Muyderman H, Sims NR. Early treatment with minocycline following stroke in rats improves functional recovery and differentially modifies responses of peri-infarct microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2019; 9 (16):1-6.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999; 96(23): 13496-13500.
- Yu X, Yang VL. Zebrafish as an alternative model for hypoxic-ischemic brain damage. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 2011; 3(2): 88.
- Zeng WX, Han YL, Zhu GF, Huang LQ, Deng YY, Wang QS, Zeng HK. Hypertonic saline attenuates expression of Notch signaling and proinflammatory mediators in activated microglia in experimentally induced cerebral ischemia and hypoxic BV-2 microglia. *BMC neuroscience* 2017; 18(1): 1-14.
- Zhang F, Chen J. Infarct measurement in focal cerebral ischemia: TTC staining. *Animal Models of Acute Neurological Injuries II*. Humana Press, 2012. 93-98.
- Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim B, Ona V, Li M, Friedlander RM. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*. 2002; 417 (6884): 74-78

ANEXOS

ANEXO A – PRIMEIRO PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**



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** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **06/04/2021**.

Título do projeto	Avaliação do efeito da minociclina em peixe-zebra submetido a modelo de hipóxia
Project title	Evaluation of the effect of minocycline on zebrafish submitted to the hypoxia model
Número do protocolo Protocol number	52/2020 Adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico
Pesquisadores Researchers	Eduardo Ronconi Dondossola, Henrique Teza Bernardo, Guilherme Lodetti da Silva, Samira Leila Baldin, Ana Caroline Salvador de Farias, Karolyne de Pieri Picler, Suzielen Damin Pacheco, Monique Michels, Emily Córneo, Natan Matos, Heloisa Borges.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/11/2020 a 12/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Peixe**/ <i>Danio rerio</i>
Idade/Peso	4 meses / 0,400g
Número de animais	Masculino = 115 + Feminino = 116 = 231
Procedência	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.

Criciúma-SC, 23 de março de 2021


Josiane Budni
 Coordenadora da CEUA

ANEXO B – SEGUNDO PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**



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** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **08/09/2021**.

Título do projeto	Avaliação do efeito de diferentes doses de minociclina em modelo de hipóxia em peixe-zebra
Project title	Evaluation of the effect of different doses of minocycline in a zebrafish hypoxia model
Número do protocolo Protocol number	66/2021
Pesquisador principal Principal Investigator	Eduardo Pacheco Rico
Pesquisadores Researchers	Heloisa de Medeiros Borges, Eduardo Ronconi Dondossola, Henrique Teza Bemardo, Guilherme Lodetti da Silva, Bárbara da Costa Pereira, Karolyne de Pieri Picler, Monique Michels, Emily Cómeo.
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/09/2021 a 04/03/2022
Espécie/linhagem/raça	Peixe**/ <i>Danio rerio</i>
Idade/Peso	4 meses / 0,400g
Número de animais	Masculino 238 + Feminino 238 = 476
Procedência	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.

Criciúma-SC, 08 de setembro de 2021

Josiane Budni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA