



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

RAUL SOUSA FREITAS

**DHA E DOCOSANOIDES PROMOVEM NEUROGÊNESE E ANGIOGÊNESE COM
MELHORA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA, ÁREA DE INFARTO E
ESCORES NEUROLÓGICOS APÓS ISQUEMIA-REPERFUSÃO CEREBRAL FOCAL
EM RATOS**

**FORTALEZA
2018**

RAUL SOUSA FREITAS

**DHA E DOCOSANOIDES PROMOVEM NEUROGÊNESE E ANGIOGÊNESE COM
MELHORA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA, ÁREA DE INFARTO E
ESCORES NEUROLÓGICOS APÓS ISQUEMIA-REPERFUSÃO CEREBRAL FOCAL
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

**FORTALEZA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F938d Freitas, Raul Sousa.
DHA E DOCOSANOÍDES PROMOVEM NEUROGÊNESE E ANGIOGÊNESE COM
MELHORA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA, ÁREA DE INFARTO E ESCORES
NEUROLÓGICOS APÓS ISQUEMIA-REPERFUSÃO CEREBRAL FOCAL EM RATOS / Raul
Sousa Freitas. – 2018.

122 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

1. Isquemia-reperfusão. 2. MCAo. 3. Neuroproteção. 4. DHA. 5. Neuroprotectina D1. I.
Título.

CDD 611

RAUL SOUSA FREITAS

**DHA E DOCOSANOIDES PROMOVEM NEUROGÊNESE E ANGIOGÊNESE COM
MELHORA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA, ÁREA DE INFARTO E
ESCORES NEUROLÓGICOS APÓS ISQUEMIA-REPERFUSÃO CEREBRAL FOCAL
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Neurociências

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá
(Orientador)**

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João José Oliveira Malva

Universidade de Coimbra (Portugal)

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, em especial minha mãe

Arleide Freitas

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter tornado tudo isso possível. Por me guiar e me fortalecer nos momentos difíceis, sem o qual nada faria sentido

Ao meu orientador Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, pelo incentivo, orientação e apoio científico. Obrigado pela oportunidade, por me aceitar como orientando, pela paciência, por toda ajuda e inúmeras contribuições importantes na minha formação acadêmica.

Ao Dr. Nicolas G. Bazan e a Dra. Ludmila Belayev do *Neuroscience Center of Excellence* da *Louisiana State University* (LSU), que me proporcionaram grandes oportunidades de pesquisa e toda a infraestrutura para a realização desse trabalho. Obrigado por suas inúmeras contribuições, incentivo, apoio e por me receberem durante meu período de doutorado sanduíche na LSU.

A Larissa Khoutorova da LSU pela assistência técnica e científica com os modelos animais e todo o apoio experimental. Obrigado por todos os ensinamentos, por compartilhar comigo a sua experiência e pela paciência durante o meu treinamento com os protocolos cirúrgicos utilizados nesse estudo. Agradeço também pela amizade, por todos os conselhos e palavras de incentivo durante nossos intermináveis dias de experimentos.

Aos amigos Shawn Marcell e Hemant Menghani, agradeço por todo apoio e ajuda durante os meus dias na LSU. Obrigado pela amizade, pelos momentos de descontração, conversas e pelo auxílio em questões técnico-científicas e experimentais.

Aos amigos do *Neuroscience Center* - LSU, Filipe Muhale, Aram Asatryam, Jarrod Harman, Bokkyoo Jun, Marie-Audrey Kautzmann, Uday Patel, Jessica Heap, Surjyadipta Bhattacharjee (Bibbo) e Elizabeth Hill pela amizade, ajuda, divertidos almoços e cafés nos intervalos dos experimentos e por todas as vezes em que pude contar com o apoio de vocês.

Aos amigos Sydney Secours, Ian Farrow, Danna Tumbaga, Sara Skjerli, Bonamico Jacobs, Alberto Vitela, Aaron Katrikh, Emili Wcislo, Phill Marcads, Robert Fuchs e Andrew Duke. Obrigado pelo imenso apoio durante a minha estadia em New Orleans. Agradeço por me apresentarem a cidade e a sua cultura, por me ajudarem no meu dia a dia, por

todos os momentos de descontração e por todas as vezes que me receberam nas minhas visitas quando precisei voltar para finalizar a execução desse trabalho.

Aos queridos amigos brasileiros das mais diversas partes do país que tive a sorte de conhecer durante o período sanduíche no exterior, Diego Musial, Deborah Gurgel, Kelly Quirino, Jaqueline Ferreira, Sabrina Gonsalez, Juliana Gagliardi, Francine Marques, Arthur Fernandes, Márcia Pereira, Fernanda Sanglard, Aline Maia e David Lima eu agradeço por terem sido a minha família em terras estrangeiras. Muito obrigado por poder ter contado com vocês quando mais precisei e por me darem todo o suporte o qual eu precisava para poder viver essa experiência.

Aos amigos do LABICONTE Lianna Cavalcante, Juliana Rêgo, Kildere Canuto, Cristhyane Costa, Robson Matos, Jardlon Costa, Daniel Pinto, Carolina Benício, Dulce Maria, Leonardo Lobo, Ronaldo Dias, Felipe Moura, Naftanael Ricarte, Amanda Ribeiro e Gabriela Araújo pela engrandecedora convivência, ajuda, amizade e incentivo.

Aos professores participantes da banca examinadora de qualificação e de defesa, pelo tempo, disponibilidade e pelas valiosas sugestões construtivas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de estudos no exterior e no Brasil.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, pela oportunidade de realização de um Curso de Doutorado.

Aos professores que compõem o corpo docente do programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, por todos os ensinamentos, conhecimento repassado e por facilitarem nosso aprendizado. Obrigado pela rica e importante contribuição na minha formação profissional/acadêmica e pessoal.

A todo o quadro de funcionários da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais. Em especial a Laísa Albuquerque. Agradeço pelo profissionalismo, disponibilidade, competência, apoio técnico e prestação de serviço.

Aos meus pais pela oportunidade, apoio e admiração. Em especial à minha mãe Arleide Freitas. Te agradeço pela paciência e compreensão durante essa minha longa caminhada. Um muito obrigado é pouco para expressar a gratidão e emoção que sinto

agora, uma emoção que jamais seria traduzida em palavras. A você todo meu amor e eterna gratidão.

Ao meu irmão Artur Freitas pelo incentivo, amizade e apoio em todos os momentos. Por ter viajado de longe para me receber em New Orleans e me ajudar de todas as formas possíveis em momentos cruciais na minha chegada e adaptação no exterior.

Aos que acreditaram em mim, torceram pelo meu sucesso e que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho e conquista desse título. Recebam o meu muito obrigado!

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita ”.

(Mahatma Gandhi)

DHA E DOCOSANOIDES PROMOVEM NEUROGÊNESE E ANGIOGÊNESE COM MELHORA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA, ÁREA DE INFARTO E ESCORES NEUROLÓGICOS APÓS ISQUEMIA-REPERFUSÃO CEREBRAL FOCAL EM RATOS

RESUMO

O ácido docosaheptaenoico (DHA) é um ácido graxo pertencente à família ômega-3, e é predominantemente encontrado nos fosfolipídios de membrana do sistema nervoso central. DHA é bem conhecido como um robusto agente neuroprotetor em modelos de isquemia-reperfusão cerebral focal e é o precursor de mediadores bioativos denominados docosanoídeos, dentre eles a neuroprotectina D1 (NPD1). NPD1 é um mediador lipídico pleiotrópico que possui importantes efeitos pró-sobrevivência celular, anti-apoptóticos, anti-inflamatórios e neuroprotetores. Embora as atividades neuroprotetoras do DHA tenham sido previamente demonstradas, seus mecanismos neuroprotetores e neurorestauradores assim como o efeito da administração direta do seu metabólito bioativo NPD1 num modelo de isquemia-reperfusão cerebral focal experimental ainda não foram completamente caracterizados. Neste trabalho foram avaliados os mecanismos neuroprotetores na barreira hematoencefálica e neurogênese na área de penumbra mediados pelo DHA e NPD1 num modelo de isquemia-reperfusão cerebral focal em ratos. Ratos *Sprague-Dawley* (SD) foram submetidos a 2h de oclusão da artéria cerebral média (MCAo), e então tratados com DHA (5 mg / kg, IV) ou NPD1 (5 ug/por rato, ICV) ou veículos 1h depois do início da reperfusão. A avaliação neurocomportamental foi realizada através dos testes de avaliação do reflexo postural e de resposta de membros anteriores induzidos realizados nos dias 1, 2, 3 e na 1ª, 2ª, 3ª ou 4ª semana pós isquemia. BrdU foi injetado nos dias 4, 5 e 6 pós-isquemia-reperfusão, análises imunohistoquímicas foram realizadas na 2ª ou 4ª semana. Imageamento por ressonância magnética (MRI) foi realizado no 7º dia e análises lipidômicas na 4ª e 5ª h após o início da isquemia. Dentre os resultados obtidos, foi observado que o tratamento com DHA melhorou as funções neurocomportamentais de curto e longo prazo reduzindo os volumes de infarto cortical, subcortical e total (em 42%, 47% e 31%, respectivamente) ao decorrer do período de de 2 semanas e reduziu ainda a perda tecidual em 50% após 4 semanas. DHA aumentou o número de células BrdU⁺/Ki-67⁺, BrdU⁺/DCX⁺ e BrdU⁺/NeuN⁺ no córtex, zona subventricular e giro dentado do hipocampo e potencializou a síntese de NPD1 na região de penumbra na 5ª h após MCAo. NPD1 melhorou o déficit motor, reduziu o volume da lesão isquêmica, protegendo a região de penumbra, aumentou o número de células NeuN⁺ e GFAP⁺, aumentou a densidade vascular e promoveu a regeneração axonal em penumbra e atenuou o dano à barreira hematoencefálica (BHE) após a MCAo. Concluímos a administração de DHA promove a neurogênese, redução da área e volume da lesão de infarto juntamente com síntese de NPD1 na região de penumbra e que o tratamento com NPD1 promove angiogênese, sobrevivência celular, regeneração nervosa e diminuição dano a BHE, o que se correlaciona com a recuperação neurocomportamental a longo-prazo após isquemia-reperfusão experimental.

Palavras-chave: Ômega-3, Neuroproteção, MCAo, Isquemia-reperfusão, DHA, NPD1

DHA AND DOCOSANOIDS PROMOTE NEUROGENESIS AND ANGIOGENESIS WITH IMPROVEMENT OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER, INFARCT AREA AND NEUROLOGICAL SCORES AFTER FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS

ABSTRACT

DHA is a member of the essential omega-3 fatty acid family and is enriched in the membranes of the central nervous system. It is also necessary for the development of the nervous system, including vision. DHA has been shown to be involved in memory formation, synaptic membrane function, aging and neuroprotection. Studies have shown that DHA is a critical component of endogenous mechanisms that protect the brain after injury. DHA is the precursor of bioactive mediators, the docosanoids and neuroprotectin D1 (NPD1; 10R,17S-dihydroxy-docosa-4Z,7Z,11E,15E,19Z hexaenoic acid), is the first identified member of this group of mediators. Neuroprotectin D1 is produced at the onset of brain ischemia-reperfusion and its neuroprotective bioactivity includes inflammatory modulation, induction of cell survival, and restoring disrupted homeostasis. Although neurorestorative and neuroprotective actions of DHA have been demonstrated after experimental stroke, its mechanisms and the effect of NPD1 administration has not been fully characterized so far. To explore underlying mechanisms, SD rats underwent 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAo) and treated with DHA (5 mg/kg, IV) or NPD1 (5 µg/per rat, ICV) and vehicles 1 h after. Neuro-behavioral assessments were conducted on days 1, 2, and 3, and on week 1, 2, 3, or 4. BrdU was injected on days 4, 5, and 6, immunohistochemistry was performed on week 2 or 4, MRI on day 7, and lipidomic analysis at 4 and 5 h after onset of stroke. DHA improved short- and long-term behavioral functions and reduced cortical, subcortical, and total infarct volumes (by 42, 47, and 31%, respectively) after 2 weeks and reduced tissue loss by 50% after 4 weeks. DHA increased the number of BrdU+/Ki-67+, BrdU+/DCX+, and BrdU+/NeuN+ cells in the cortex, subventricular zone, and dentate gyrus and potentiated NPD1 synthesis in the penumbra at 5 h after MCAo. NPD1 improved behavior, reduced lesion volumes, protected ischemic penumbra, increased NeuN, GFAP, SMI-71-positive cells and vessels, axonal regeneration in the penumbra, and attenuated blood-brain barrier (BBB) after MCAo. We conclude that docosanoid administration increases neurogenesis and angiogenesis, activates NPD1 synthesis in the penumbra, and diminishes BBB permeability, which correlates to long-term neurobehavioral recovery after experimental ischemic stroke.

Keywords: Omega-3 fatty acids, Behavior, MRI, BBB, Neuroprotection, DHA, NPD1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção dos principais eicosanoides no cérebro em decorrência do insulto isquêmico	26
Figura 2. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) mediante isquemia cerebral	28
Figura 3. Fenótipos de ativação microglial após AVC isquêmico	31
Figura 4. Astroglíose reativa mediante isquemia cerebral	33
Figura 5. Estrutura da barreira hematoencefálica (BHE).....	36
Figura 6. Processo de neurogênese no cérebro adulto.....	37
Figura 7. Biosíntese da neuroprotectina D1 (NPD1)	50
Figura 8. Preparação para o procedimento cirúrgico de oclusão da artéria cerebral média (MCAo) em ratos	55
Figura 9. Oclusão da artéria cerebral média (MCAo) por filamento intraluminal	56
Figura 10. Procedimento cirúrgico de oclusão da artéria cerebral média (MCAo) em ratos	57
Figura 11. Avaliação neurocomportamental do reflexo postural.....	60
Figura 12. Avaliação neurocomportamental da resposta de membros anteriores induzidos	60

Figura 13. Efeito do DHA sobre a evolução neurológica de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) durante o período de 2 semanas após isquemia-reperfusão	70
Figura 14. Efeito do DHA sobre as alterações histopatológicas em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 2 semanas após isquemia-reperfusão	71
Figura 15. Efeito do DHA sobre a neurogênese em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 2 semanas após isquemia-reperfusão	73
Figura 16. Efeito do DHA sobre o número de células BrdU ⁺ , DCX ⁺ e NeuN ⁺ nas regiões do córtex, zona subventricular (SVZ) e giro denteado (GD) de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 2 semanas após isquemia-reperfusão	74
Figura 17. Efeito do DHA sobre a evolução neurológica total de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 4 semanas após isquemia-reperfusão	75
Figura 18. Efeito do DHA sobre as alterações histopatológicas em ratos em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 4 semanas após isquemia-reperfusão	76
Figura 19. Efeito do DHA sobre o dano celular isquêmico: Apoptose neuronal, infiltração microglial e astrócitos reativos nas regiões corticais e subcorticais em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 4 semanas após isquemia-reperfusão	78

Figura 20. Efeito do DHA sobre o número de células NeuN ⁺ , GFAP ⁺ e intensidade de fluorescência da imunomarcção por Iba-1 nas regiões de peri-infarto do córtex e subcórtex de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 4 semanas após isquemia-reperfusão	79
Figura 21. Efeito do DHA sobre a neurogênese no giro denteado de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 4 semanas após isquemia-reperfusão	80
Figura 22. Efeito do DHA sobre a evolução neurológica e síntese de NPD1 na área de penumbra isquêmica de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) na 4 ^a e 5 ^a hora após isquemia-reperfusão	81
Figura 23. Efeito do NPD1 sobre a evolução neurológica total de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) durante o período de 7 dias	82
Figura 24. Imageamento por ressonância magnética <i>ex vivo</i> do cérebro de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperfusão	83
Figura 25. Efeito do NPD1 sobre as alterações histopatológicas de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperfusão	84
Figura 26. Efeito do NPD1 sobre o dano celular isquêmico neuronal, vascular e glial no hemisfério ipsilateral de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperfusão	85
Figura 27. Efeito do NPD1 sobre o número de células NeuN ⁺ , SMI-71 ⁺ e GFAP ⁺ na região cortical e subcortical de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperfusão	86

Figura 28. Efeito do NPD1 sobre a ruptura da unidade neurovascular (UNV) de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperusão87

Figura 29. Efeito do NPD1 sobre a regeneração e densidade axonal na região de penumbra de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperusão88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos escores neurológicos dos testes neurocomportamentais	59
Tabela 2. Distribuição dos marcadores celulares utilizados e suas respectivas funções.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ACI	Artéria carótida interna
ACC	Artéria carótida comum
ACE	Artéria carótida externa
ACM	Artéria cerebral média
ALA	Ácido alfa-linolênico
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
BrdU	Bromodeoxiuridina
Ca ²⁺	Cálcio
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CSF	Líquido cefalorraquidiano artificial
DCX	<i>Double cortin</i>
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSCL	Fluxo sanguíneo cerebral local
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GD	Giro denteado
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
5-HT	Serotonina
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee
ICV	Intracerebroventricular
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1	Interleucina 1

IL-10	Interleucina 10
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IR	Isquemia-reperfusão
IV	Intravenosa
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MCAo	Oclusão da artéria cerebral média
MDA	Malondialdeído
MMPs	Metaloproteinases
Na ⁺	Sódio
NeuN	Antígeno nuclear neuronal
NO	Óxido nítrico
NPD1	Neuroprotectina D1
NPD1-SS	Neuroprotectina D1 forma sal de sódio
NPD1-ME	Neuroprotectina D1 forma metil éster
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NGF	Fator de crescimento neural
NSCs	Células tronco neurais
OB	Bulbo olfatório
*OH	Radical hidroxila reativo
PUFAS	Ácidos graxos poli-insaturados
PFA	Paraformaldeído
pGAP-43	Proteína associada ao crescimento fosforilada 43kD
RMS	Fluxo migratório rostral
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SD	<i>Sprague-Dawley</i>
SGZ	Zona subgranular
SNC	Sistema nervoso central
SVZ	Zona subventricular
TGF- β	Fator transformador de crescimento β
tPA	Ativador do plasminogênio tecidual
UNV	Unidade neurovascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Acidente vascular cerebral	22
1.2 AVC isquêmico	23
1.2.1 <i>Fisiopatologia do AVC isquêmico</i>	24
1.2.2 <i>Deprivação de oxigênio e ATP</i>	25
1.2.3 <i>Estresse oxidativo e peroxidação lipídica</i>	26
1.2.4 <i>Conceito de núcleo (core) e penumbra isquêmica</i>	28
1.2.5 <i>Neuroinflamação e isquemia</i>	30
1.2.6 <i>Barreira hematoencefálica e isquemia</i>	34
1.3 Neurogênese: desenvolvimento inicial e neurogênese no cérebro adulto	36
1.3.1 <i>Fases da neurogênese adulta e expressão de marcadores celulares específicos</i>	39
1.3.2 <i>Neurogênese em resposta ao AVC isquêmico</i>	43
1.4 Tratamento atual do AVC isquêmico	45
1.5 Ácidos graxos ômega-3: ácido docosahexaenoico (DHA)	46
1.6 Docosanoides: neuroprotectina D1 (NPD1) e neuroproteção	49
2. JUSTIFICATIVA	51
3. OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4. MATERIAL E MÉTODO	54
4.1 Animais	54
4.2 Modelo experimental	54
4.2.1 <i>Anestesia e preparo para procedimento cirúrgico</i>	54
4.2.2 <i>Preparo do fio de sutura para oclusão da artéria cerebral média</i>	55
4.2.3 <i>Oclusão da artéria cerebral média (MCAo)</i>	56
4.3 Testes neurocomportamentais	58

4.3.1 Teste de avaliação neurocomportamental do reflexo postural (<i>Postural Reflex</i>).....	59
4.3.2 Teste de resposta de membros anteriores induzidos (<i>Placing Test</i>).....	60
4.4 Grupos experimentais e tratamentos.....	61
4.5 Procedimento para administração de NPD1.....	61
4.6 Desenho experimental.....	62
4.7 Ensaio de marcação com 5-Bromo-2'-Deoxiuridina (BrdU) <i>in vivo</i>.....	63
4.8 Análises histopatológicas.....	63
4.9 Análises imunohistoquímicas.....	64
4.10 Imageamento por ressonância magnética (MRI) <i>ex vivo</i> e detecção dos volumes de lesão do core, penumbra e volume total.....	66
4.11 Análise lipídômica.....	67
4.11.1 Preparo das amostras.....	67
4.11.2 Extração lipídica.....	67
4.11.3 Cromatografia líquida/ Espectrometria de massa.....	68
4.12 Análise estatística.....	68
5. RESULTADOS.....	69
5.1 Análise das variáveis fisiológicas.....	69
5.2 DHA promoveu a recuperação neurocomportamental 2 semanas após MCAo.....	69
5.3 DHA melhorou os achados histopatológicos reduzindo a área e volume de infarto cortical, subcortical e total 2 semanas após MCAo.....	70
5.4 DHA promoveu sobrevivência celular e favoreceu a neurogênese 2 semanas após MCAo.....	72
5.5 Tratamento com DHA promoveu a recuperação neurocomportamental 4 semanas após MCAo.....	74

5.6 DHA melhorou os achados histopatológicos preservando o volume tecidual residual e reduzindo a perda tecidual total e relativa 4 semanas após MCAo.....	75
5.7 DHA atenuou o dano celular preservando o número de neurônios na região de infarto, reduzindo apoptose neuronal, infiltração microglial e o número de astrócitos reativos 4 semanas após MCAo.....	77
5.8 DHA favoreceu a neurogênese aumentando o número de células DCX⁺ positivas no GD e promovendo crescimento dendrítico 4 semanas após MCAo.....	79
5.9 DHA melhorou a recuperação neurocomportamental e promoveu a síntese de NPD1 na área de penumbra isquêmica na 5^a hora após MCAo.....	81
5.10 Neuroprotectina D1 (NPD1) promoveu a recuperação funcional motora, protegendo a área penumbra por meio da redução dos volumes das lesões de Infarto evidenciados por imageamento por ressonância magnética (MRI) 7 dias após MCAo.....	82
5.11 Neuroprotectina D1 (NPD1) reduziu os volumes de infarto cortical, subcortical e total em análise histopatológica 7 dias após MCAo.....	83
5.12 Neuroprotectina D1 (NPD1) atenuou o dano celular, favoreceu a angiogênese e reduziu a ruptura da unidade neurovascular (UVN) 7 dias após MCAo.....	84
5.13 Neuroprotectina D1 (NPD1) promoveu regeneração e aumento da densidade axonal 7 dias após MCAo.....	85
6. DISCUSSÃO.....	89
7. CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidente vascular cerebral

Segundo a Organização Mundial de Saúde o acidente vascular cerebral (AVC) é definido como uma lesão cerebral resultante da interrupção aguda do fluxo sanguíneo arterial devido a presença de um êmbolo ou trombo (coágulo), pela formação de placas ateroscleróticas, pela pressão de perfusão cerebral insuficiente ou pela ruptura de uma artéria. Ainda de acordo com a OMS, o AVC pode se apresentar com o desenvolvimento rápido de sinais clínicos decorrentes de distúrbios focais ou globais de origem vascular e com duração superior a 24 horas (ou que causa morte) (WHO, 2006).

O AVC corresponde a uma das principais causas de óbitos e a principal causa de sequelas incapacitantes no mundo, sendo que dois terços destas ocorrem em países subdesenvolvidos podendo ser classificado, de acordo com sua etiologia, em dois subtipos patológicos: isquêmico e hemorrágico. O subtipo anóxico-isquêmico possui três variedades (lacunar, aterosclerótico e embólico), de acordo com os supostos mecanismos de lesão encefálica que, de maneira geral, decorre da falência vasogênica, culminando em déficit de oxigênio e substratos, particularmente oxigênio e glicose, para o tecido nervoso. Por sua vez, a variedade hemorrágica possui duas categorias (intraparenquimatoso ou subaracnoide) e decorre do extravasamento de sangue para dentro ou para o entorno das estruturas do encéfalo (BENJAMIN et al., 2017; SACCO et al., 2013).

O AVC é a quinta principal causa de morte e a principal causa de incapacidade em adultos a longo prazo nos Estados Unidos, sendo cerca de 87% de todos os casos de acidentes vasculares cerebrais do tipo isquêmico (MOZAFFARIAN et al., 2015). Menos frequentemente, (<15%), os AVCs são decorrentes de hemorragia ou parada cardíaca (MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010). Anualmente, 795.000 pessoas apresentam um novo ou recorrente caso de AVC sendo que 41% dos pacientes evoluem para óbito. A idade é independentemente o principal fator de risco para o acidente vascular cerebral, onde com o envelhecimento da população, os números absolutos tendem a subir (TOWFIGHI et al., 2017).

Embora alguns pacientes sobrevivam ao AVC, estes indivíduos podem apresentar sequelas que incluem prejuízos na capacidade de locomoção, sensibilidade, visão, linguagem e cognição. Entre os sobreviventes, a capacidade laboral é comprometida em até 70% das vítimas e 30% precisam de assistência para o autocuidado. Nenhum grupo racial ou étnico está imune, sendo este um problema de saúde de acometimento global (LLOYD-JONES et al., 2010).

1.2. AVC isquêmico

O AVC isquêmico ou isquemia cerebral é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade humana, caracteriza-se pela deficiência transitória ou permanente do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) com intensidade suficiente para iniciar alterações metabólicas e lesões encefálicas, reversíveis ou irreversíveis, que alteram a integridade estrutural e metabólica do neurônio (HU et al., 2017).

O acidente vascular cerebral (AVC), que pode ser resultado da lesão por isquemia e reperfusão, é a segunda causa de morte no mundo e a primeira causa de morte nos países desenvolvidos com 6,7 milhões de pessoas mortas por ano. Conforme a Organização Mundial de Saúde, no Brasil são registradas cerca de 68 mil mortes por AVC anualmente. A doença representa a terceira causa de morte e de incapacitação no país, o que gera grande impacto econômico e social, levando a maiores gastos no sistema público de saúde com altas taxas de mortalidade e morbidade (NAGHAVI et al., 2015).

A isquemia cerebral pode ser resultante de várias doenças que acometem o leito vascular cerebral - a maioria envolvendo as artérias carótidas e/ou as artérias do polígono de Willis, principalmente a artéria cerebral média, por meio de obstrução (LIVESAY, 2014) ou decorrente de procedimento cirúrgico ou trauma, com diminuição do fluxo sanguíneo da região acometida, comprometendo o acesso de nutrientes, assim como de oxigênio, e que pode ou não ser agravado durante a reperfusão (retorno do fluxo sanguíneo normal), dependendo do tempo de isquemia (CRONENWETT; JOHNSTON; RUTHERFORD, 2014).

1.2.1. Fisiopatologia do AVC isquêmico

AVC isquêmico é o mais comum entre os dois tipos de AVC conhecidos, representando 87% de todos os AVCs (MOZAFFARIAN et al., 2015). AVC isquêmico ocorre quando o aporte sanguíneo para o cérebro encontra-se reduzido, o que pode ser desencadeado por meio da oclusão de vasos cervico-cranianos ou por hipoperfusão cerebral, causada por variados processos: trombose, embolia ou anormalidades hemodinâmicas (DONNAN et al., 2008).

A causa mais comum é a trombose, onde um trombo ou coágulo sanguíneo é formado localmente em uma área de estreitamento arterial aterosclerótico o qual impede o fluxo sanguíneo distal e causa isquemia e consequente infarto do tecido cerebral suprido pelo vaso ocluído (KHAN et al., 2017). O infarto do tipo embólico é responsável por cerca de 30% dos casos de AVC isquêmico, onde a redução súbita de perfusão arterial para uma determinada área do cérebro gera sinais clínicos abruptos. A embolia, geralmente, ocorre devido a alterações cardíacas (sendo as mais comuns as valvulopatias cardíacas, o aneurisma ventricular e as miocardiopatias), apesar de também ocorrerem devido a complicações cirúrgicas nos pulmões ou devido a fraturas ósseas que podem levar ao desenvolvimento de um quadro de embolia gordurosa (NOUH et al., 2016).

Outra anormalidade que também está associada à isquemia cerebral, é a ocorrência de grandes reduções na pressão sanguínea. A hipoperfusão sistêmica é caracterizada por fluxo sanguíneo cerebral criticamente reduzido causado por falência cardíaca ou hipovolemia que leva a uma redução global do fluxo sanguíneo. Dessa forma o sistema nervoso central (SNC) pode sofrer lesões isquêmicas globais como em casos de parada cardíaca e focais como em situações de falência do suporte sanguíneo restrita a uma parte específica do cérebro (DE LA TORRE, 2012).

Após um período de isquemia, inicia-se uma complexa cadeia de eventos fisiopatológicos envolvendo diversos mecanismos que levam ao dano neuronal. A lesão isquêmica no tecido cerebral evolui quando o fluxo sanguíneo diminui e fica abaixo da taxa mínima necessária para o fornecimento de quantidades adequadas de oxigênio e nutrientes para o suporte do metabolismo energético (HOSSMANN, 2009).

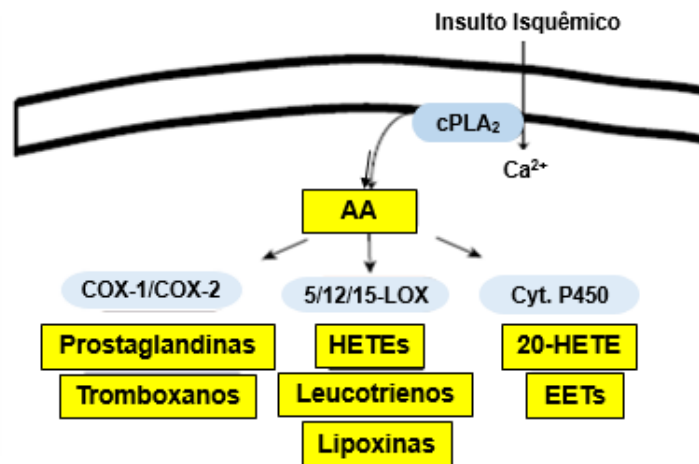
1.2.2. Deprivação de oxigênio e ATP

A expressão genérica “acidente vascular cerebral” refere-se ao súbito comprometimento da função cerebral, provocado por uma variedade de alterações histopatológicas, envolvendo um (focal) ou vários (multifocal) vasos sanguíneos intra ou extracranianos, levando a redução do suprimento sanguíneo, resultando na redução da tensão de oxigênio (hipóxia) e metabólitos de alta energia no tecido cerebral (principalmente ATP e glicose). A deprivação de ATP na célula causa a falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+) levando a um maior acúmulo de Na^+ intracelular, perda de potássio (K^+), perda da permeabilidade seletiva das membranas celulares, edema da célula e das organelas. Simultaneamente, ocorre aumento do influxo de cálcio (Ca^+) e de cloreto para o meio intracelular (HERTZ et al., 2015; SONG et al., 2014).

Por sua vez, o aumento de cálcio intracelular ativa uma série de enzimas, com efeitos celulares potencialmente deletérios. Entre as enzimas, incluem-se as fosfolipases, proteases, ATPases e endonucleases (KRISTIÁN, 2004; LI et al., 2007). A maior parte do ATP gerado é utilizada pelo cérebro para manter homeostase intracelular e gradientes de íons transmembrana de sódio, potássio e cálcio. Essa descompensação energética, resultado da depleção de ATP frente a um processo isquêmico, leva a despolarização da membrana e na liberação de neurotransmissores, como glutamato e dopamina (ADIBHATLA; HATCHER, 2005).

Os excessos da liberação de glutamato assim como a estimulação de seus receptores levam a ativação de fosfolipase A2 (PLA_2), resultando na hidrólise dos fosfolípidios de membrana e na liberação de ácidos graxos livres, incluindo o ácido araquidônico, um precursor metabólico para importantes eicosanoides de sinalização celular (**Figura 1**). A ocorrência desses processos levam à morte celular necrótica ou apoptótica (MURALIKRISHNA ADIBHATLA; HATCHER, 2006).

Figura 1. Produção dos principais eicosanoides no cérebro em decorrência do insulto isquêmico



Fonte: (VAN LEYEN, 2017), adaptado

Fosfolipase A2 ativada (cPLA₂); ácido araquidônico (AA); cicloxigenase-1/cicloxigenase-2 (COX-1/COX-2); lipoxinas-5/12/15; ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETE); citocromo p450 (Cyt.P450); ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs)

1.2.3. Estresse oxidativo e peroxidação lipídica

O estresse oxidativo desempenha um papel crítico na lesão cerebral isquêmica e ocorre quando há uma superprodução de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) que supera a capacidade dos sistemas biológicos de neutralizar seus efeitos adversos. EROs incluem íons de oxigênio, radicais livres e peróxidos, e são subprodutos do metabolismo celular (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009). O ferro e seus metabólitos são cruciais na formação e neutralização de ROS. Os neurônios têm alto consumo de oxigênio, presença de agentes antioxidantes em concentrações baixas (ou seja, catalase e glutatona) e são extremamente vulneráveis ao estresse oxidativo. Além disso, as membranas celulares neuronais são ricas em ácidos graxos poli-insaturados e, portanto, propensas a danos por EROs. O cérebro consome cerca de 20% do oxigênio corporal e suas células possuem níveis elevados de ferro, que age como um pró-oxidante sob condições patológicas (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009; PRADEEP et al., 2012; YAMATO; EGASHIRA; UTSUMI, 2003).

Paradoxalmente, após a fase de isquemia o estresse oxidativo pode ser ainda prolongado durante a fase de reperfusão. A fase de reperfusão se caracteriza pelo retorno

do fluxo de sangue oxigenado aos tecidos previamente desprovidos de oxigênio, sendo fundamental para o reinício do metabolismo aeróbico (GRANGER; KVIETYS, 2015). Entretanto, em certas circunstâncias, quando o fluxo sanguíneo é restaurado para as células isquêmicas, mas que ainda estavam viáveis, com frequência, a lesão pode se tornar paradoxalmente maior, e prosseguir em velocidade acelerada. Isso é chamado de lesão da isquemia/reperfusão, que varia de acordo com a intensidade e duração do tempo de isquemia e com a disfunção endotelial (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009; GRANGER; KVIETYS, 2015; TANO; GOLLASCH, 2014). Durante a reperfusão, ocorre a reoxigenação do tecido cerebral o que pode gerar um aumento de radicais livres nas células neuronais, endoteliais e da glia (SONG et al., 2014).

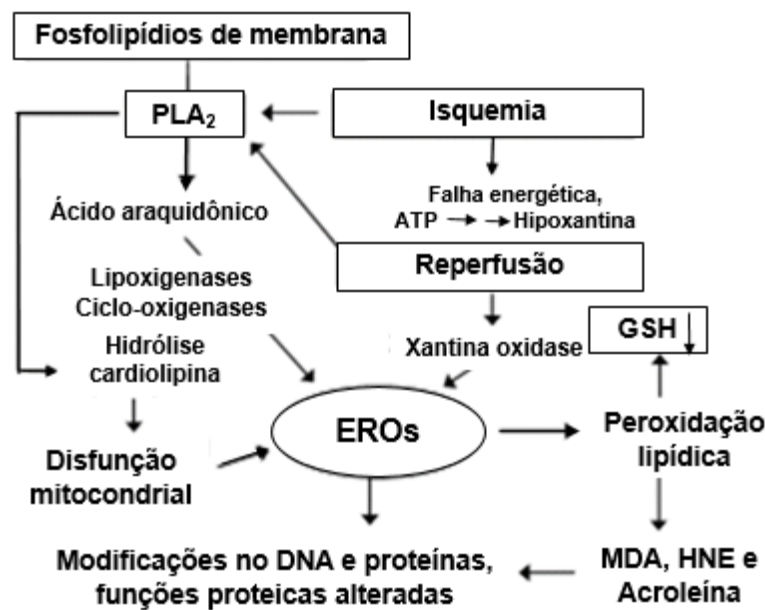
Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) contêm um ou mais elétrons não emparelhados no átomo ou molécula, aumentando assim a reatividade química, conferindo-lhes grande instabilidade. O mais simples é representado por um átomo de hidrogênio com um próton e um único elétron. Além destes, são também EROs, o superóxido e os radicais hidroxila. O aumento do cálcio citosólico leva também a ativação da isoforma da NO sintase induzida (NOS₂), via calmodulina, produzindo NO que interage com EROs, culminando com a produção de radicais livres nitrogenados (p. ex. peroxinitritos) e aumentando, assim, a área de lesão (NASH; SCHIEFER; SHAH, 2018; OLMEZ; OZYURT, 2012).

O radical hidroxila altamente reativo (*OH) uma vez formado, reage quase que instantaneamente com uma série de componentes celulares, incluindo ácidos graxos poli-insaturados presentes nos lipídeos de membrana. A reação inicial entre *OH com ácidos graxos poli-insaturados produz um radical alquila, que por sua vez reage com o oxigênio molecular para formar um radical peroxila (ROO^{*}). ROO^{*} pode abstrair hidrogênio de um ácido graxo adjacente para produzir um hidroperóxido lipídico (ROOH) e um segundo radical alquila, propagando dessa forma uma reação de peroxidação lipídica em cadeia (CHEN; JOSHI; MOCHLY-ROSEN, 2016; LEE et al., 2012)

A peroxidação lipídica prejudica a organização da membrana, causando alterações na fluidez e permeabilidade, inibição de processos metabólicos e alterações do transporte iônico. O dano mitocondrial induzido por esse processo pode levar a uma produção ainda maior de EROs (MURALIKRISHNA ADIBHATLA; HATCHER, 2006).

Por fim o processo de peroxidação lipídica leva a reações de “fragmentação” ou “cisão” nas quais os peróxidos lipídicos produtos dos ácidos graxos poli-insaturados peroxidados se decompõem dando origem a subprodutos neurotóxicos aldeídicos reativos incluindo, malondialdeído (MDA), 4-hidroxinoneal (4-HNE) e 2-propenal (acroleína) (**Figura 2**) (BUTTERFIELD; BADER LANGE; SULTANA, 2010; ZARROUKI et al., 2007). Estes produtos finais contêm porções carbonilo reativas que podem ligar-se covalentemente a aminoácidos básicos, tais como lisina ou histidina, bem como resíduos de cisteína contendo sulfidrilo em proteínas, prejudicando assim as funções proteicas (CHEN; JOSHI; MOCHLY-ROSEN, 2016; MURALIKRISHNA ADIBHATLA; HATCHER, 2006).

Figura 2. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) mediante isquemia cerebral



Fonte: (MURALIKRISHNA ADIBHATLA; HATCHER, 2006), adaptado Fosfolipase A2 (PLA₂); espécies reativas de oxigênio (EROs); malonaldeído (MDA); 4-hidroxinoneal (HNE); glutathiona peroxidase (GSH).

1.2.4. Conceito de núcleo (Core) e penumbra isquêmica

No AVC isquêmico, o suprimento sanguíneo comprometido leva ao déficit funcional, seguido por desintegração estrutural dos neurônios na ausência de reperfusão. No entanto, a fase inicial dessa disfunção é potencialmente reversível, antes da morte celular subsequente. Enquanto que parte do tecido cerebral pode ser irreversivelmente

danificado, outras áreas cerebrais com hipoperfusão podem estar em risco de dano celular permanente, mas este é potencialmente reversível (EBINGER et al., 2009).

É importante levar em consideração acerca do fluxo sanguíneo cerebral local (FSCL) para que se possa entender a evolução e consequências sobre o dano celular produzido pelo ataque isquêmico focal. Astrup e colaboradores demonstraram que após o início da isquemia focal, em um cérebro de primata não-humano, por meio da medição de atividade elétrica que algumas regiões sob isquemia eram disfuncionais, mas ainda não mortas. Nas áreas centrais da zona isquêmica, os déficits no fluxo sanguíneo foram considerados drásticos levando às células rapidamente a morte. Nessas áreas, a capacidade dos neurônios de disparar potenciais de ação foi perdida. No entanto, nas áreas periféricas ao centro da zona isquêmica, os déficits no aporte sanguíneo foram menos severos. Foi então observado quando a pressão arterial foi aumentada, com consequente melhora do fluxo sanguíneo colateral, essas áreas se recuperaram e os potenciais de ação foram restaurados transitoriamente (ASTRUP et al., 1977).

O *core* e a penumbra isquêmicos são descritos como um anel de parênquima cerebral adjacente à área central densa do infarto isquêmico (SCALZO; NOUR; LIEBESKIND, 2015). A isquemia cerebral focal produz uma lesão cerebral composta de um núcleo ou *core* lesionado irreversivelmente e uma zona periférica, denominada de penumbra, onde o tecido encontra-se danificado, porém não de forma permanente, sendo esse dano potencialmente reversível (MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010).

Portanto, o *core* é uma área de isquemia severa com FSCL abaixo de 20 ml/100 c/min, onde a falta de oxigênio e glicose resulta em depleção rápida dos estoques de energia. A isquemia grave resulta em necrose de neurônios e das células da glia no interior da zona central da região infartada. A penumbra apresenta um tecido moderadamente isquêmico e parcialmente perfundido (FSCL abaixo de 40 ml/100 c/min) (EADY et al., 2012).

A penumbra tem um tempo de vida limitado e parece sofrer danos irreversíveis dentro do período de algumas horas, a menos que a reperfusão seja iniciada e/ou uma terapia neuroprotetora seja administrada (LO, 2008). De forma que pesquisas continuam a investigar a fisiopatologia da penumbra isquêmica para intervenções terapêuticas na tentativa de recuperar o tecido cerebral comprometido após isquemia.

1.2.5 Neuroinflamação e isquemia

A neuroinflamação é uma característica comum das doenças neurodegenerativas e caracteriza-se por micro e astrogliose e aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias. O processo inflamatório é provavelmente promovido pelo acúmulo de agregados proteicos e danos celulares (WALTER, 2016).

Após acidente vascular cerebral isquêmico, uma resposta inflamatória é iniciada em poucas horas, com a ativação de micróglia e astrócitos e a produção de citocinas e quimiocinas com a subsequente infiltração de células derivadas do sangue, como os leucócitos (IADECOLA; ANRATHER, 2011).

A ativação das células que compõem a micróglia se constitui como o evento inicial do processo inflamatório no AVC isquêmico, levando à produção de mediadores pró e anti-inflamatórios. Em resposta a várias moléculas de sinalização, a micróglia prolifera e migra para o local da lesão (LEE et al., 2014). Micróglia são considerados macrófagos residentes no SNC com alto poder fagocitário que respondem a eventos patológicos no sistema nervoso central (STOLLG; JANDER, 1999).

A isquemia cerebral produz uma forte resposta inflamatória, sendo a micróglia ativada precocemente na fronteira da zona do infarto. Micróglia, quando ativada, tipicamente inicia uma resposta inflamatória que resulta em apoptose e remoção de detritos celulares além de produzir citocinas e metaloproteinases de matriz (MMPs) que danificam e alteram a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) (LOURBOPOULOS; ERTÜRK; HELLAL, 2015).

Micróglia tem a capacidade de se transformar em uma gama de estados ativados com fenótipos de polarização. A plasticidade dessas células inflamatórias tem sido destacada usando as classificações M1 e M2 para enfatizar seus fenótipos potencialmente destrutivos ou reparativos (LAWRENCE; NATOLI, 2011).

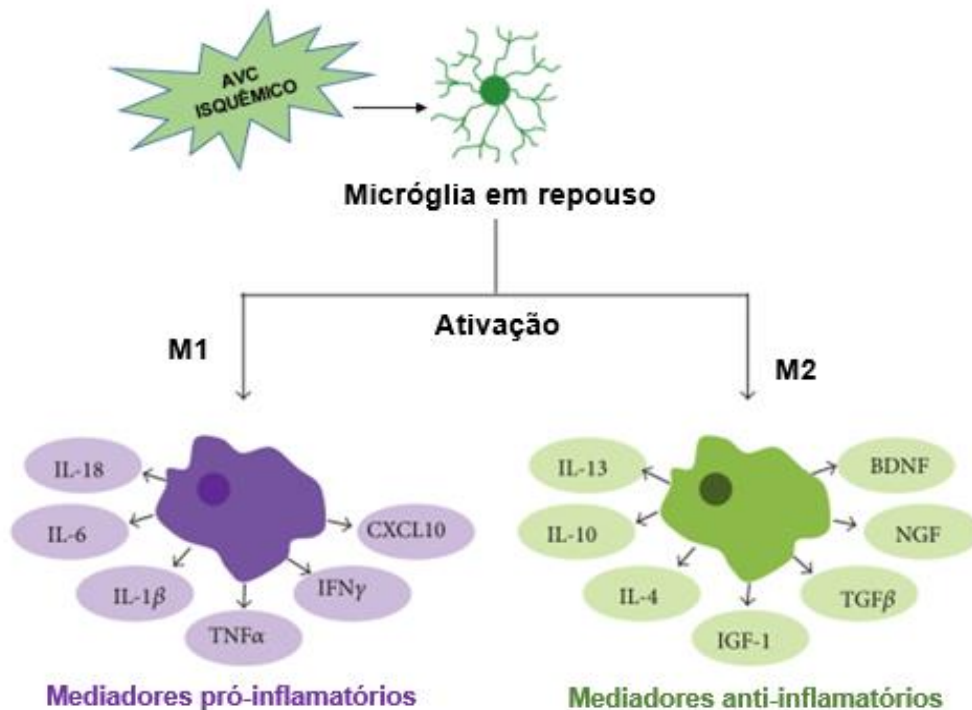
Durante a ativação microglial após isquemia cerebral, a morfologia é alterada para M1, fenótipo tipicamente ativado, ou para M2, um fenótipo alternativamente ativado; essa troca fenotípica depende do tipo de estímulo (**Figura 3**). Células da micróglia expressando o fenótipo M2, são consideradas células reparativas que contribuem para a recuperação de danos por meio da secreção mediadores anti-inflamatórios como IL-10, TGF- β , IL-4, IL-13 e IGF-1 assim como vários outros fatores neurotróficos (HANISCH;

KETTENMANN, 2007; SHIN et al., 2004; TAYLOR; SANSING, 2013; ZHOU; SPITTAU; KRIEGLSTEIN, 2012).

Micróglia expressando M1 são células consideradas pró-inflamatórias, produzindo uma série de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1, IFN- γ . Micróglia M1 expressa CD80, CD86 e MHC classe II na membrana celular e realizam a apresentação de antígenos para células T (STAROSSOM et al., 2013). Além disso, micróglia M1 tende a induzir a morte celular neuronal mais prontamente do que micróglia M2 (HU et al., 2012).

No AVC isquêmico, o fenótipo M2 é dominante na micróglia local e nos macrófagos recém-recrutados nos estágios iniciais, mas a população do fenótipo M1 aumenta progressivamente nas regiões peri-infarto, sugerindo que os neurônios sob condições isquêmicas desencadeiam alterações no fenótipo M2 na micróglia e macrófagos (HU et al., 2012).

Figura 3. Fenótipos de ativação microglial após AVC isquêmico



Fonte: (LEE et al., 2014), adaptado

A fagocitose microgliótica também desempenha um importante papel na restauração da homeostase tecidual por meio da remoção de patógenos e células necróticas, suprimindo a inflamação e facilitando a reparação tecidual cerebral (NEUMANN; KOTTER; FRANKLIN, 2009).

A infiltração neutrofílica é um outro evento inflamatório precoce observado após a isquemia cerebral e ocorre devido a alterações microvasculares que incluem alterações na expressão de moléculas de adesão e aumento da permeabilidade endotelial. Neutrófilos assim como outros glóbulos brancos migratórios também podem participar de mecanismos secundários de lesão por meio da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres de oxigênio (LEE et al., 2014).

Os processos inflamatórios subsequentes, incluindo a agregação leucocitária e a migração através da BHE resultam em perturbações hemodinâmicas e processos que levam a dano tecidual secundário (JIN; YANG; LI, 2010). Durante a fase de reperfusão, os leucócitos ativados ligam-se às células endoteliais estimulados por sinais quimiotáticos por meio da expressão de proteínas de adesão, com subsequente liberação de metaloproteínases de matriz e agentes oxidantes (mieloperoxidase), provocando danos e aumento da permeabilidade da BHE. Os leucócitos extravasam dos capilares e se infiltram no tecido cerebral liberando citocinas inflamatórias que resultam no aumento da lesão isquêmica e deterioração da penumbra (PAN et al., 2007).

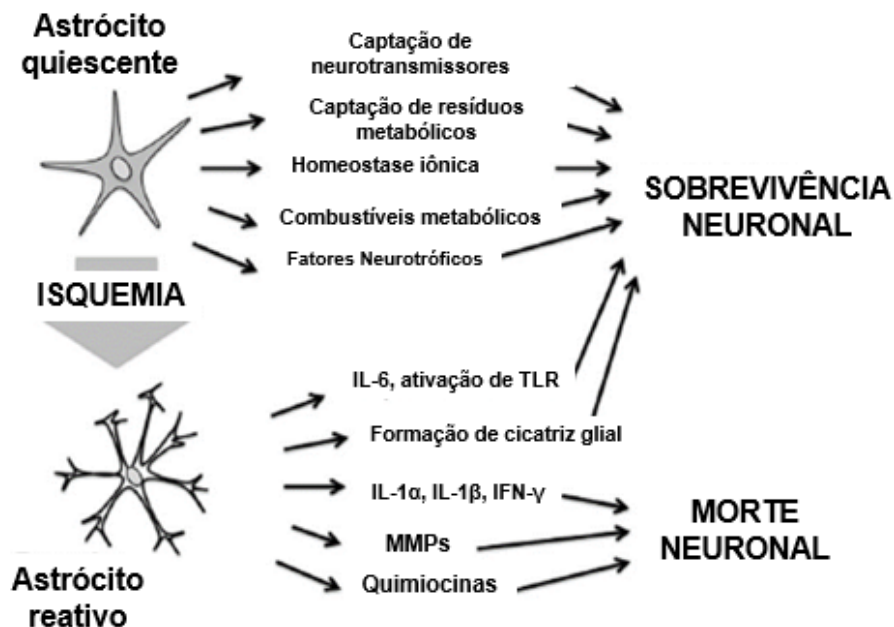
As estratégias terapêuticas que tem como alvo o dano tecidual que ocorre na fase de reperfusão mediada por leucócitos incluem inibição da síntese de moléculas de adesão leucocitária, liberação de fatores inflamatórios e a adesão de leucócitos mediada por receptor às células endoteliais. Recentes estudos que utilizaram compostos objetivando inibição da formação do infiltrado neutrofílico na isquemia cerebral focal apresentaram atividade neuroprotetora associada à redução significativa do infarto (BELAYEV et al., 2008, 2012).

No cérebro não lesionado, os astrócitos mantêm a homeostase neuronal funcional, incluindo eliminação de resíduos metabólicos após a atividade sináptica, mantendo a homeostase iônica e fluida, e fornecendo suporte neurotrófico via liberação e captação de fatores tróficos. Os astrócitos contribuem para a manutenção da barreira hematoencefálica (BHE) como um componente da unidade neurovascular (NVU), uma

estrutura dinâmica também composta de células endoteliais, perícitos, membrana basal e neurônios circundantes (BARRETO et al., 2011).

Em resposta a isquemia cerebral, os astrócitos podem sofrer alterações morfológicas e fenotípicas que podem exacerbar paradoxalmente a lesão, denominada astrogliose reativa (**Figura 4**). Os astrócitos, após a isquemia, se tornam ativados, resultando no aumento da expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), também chamada de gliose reativa, caracterizada por mudanças específicas na estrutura e função destas células (TAKANO et al., 2009).

Figura 4. Astrogliose reativa mediante isquemia cerebral



Fonte: (STARY; LI; GIFFARD, 2017), adaptado

Astrócitos quando reativos produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β e IFN- γ), que podem contribuir para a morte de células neuronais diretamente, induzindo apoptose, ou indiretamente, via produção local elevada de óxido nítrico, secundária devido à ativação de iNOS nestas células. Além disso, essas células quando ativadas produzem quimiocinas, como a proteína quimioatraente de monócitos-1, resultando no recrutamento de células imunológicas circulantes, podendo contribuir para o aumento da lesão (LIU; CHOPP, 2017).

A ativação de astrócitos evita a propagação de danos cerebrais isquêmicos, mas isso pode depender, em parte, da polarização destes em direção a fenótipos específicos. Os fenótipos induzidos pelo AVC isquêmico parecem ser regulados por neurônios circundantes e micróglia. Portanto, a resposta neuroinflamatória dos astrócitos à isquemia cerebral parece ser multifacetada e, em geral, as abordagens farmacêuticas anti-inflamatórias que visam os astrócitos provavelmente produzem efeitos indesejáveis (RUSNAKOVA et al., 2013; YU et al., 2015).

A elucidação dos mecanismos que induzem os astrócitos a produzir mediadores inflamatórios deletérios versus mediadores protetores se constitui como o próximo passo essencial para o desenvolvimento de uma abordagem efetiva que possibilite modular a função destas células para a redução da lesão isquêmica favorecendo assim a recuperação e regeneração tecidual após acidente vascular cerebral isquêmico focal.

1.2.6. Barreira hematoencefálica e isquemia

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira física e bioquímica essencial que separa o SNC da circulação sistêmica. A BHE é constituída por uma monocamada de células endoteliais capilares que interagem umas com as outras, assim como com outros componentes da unidade neurovascular (isto é, astrócitos, micróglia, neurônios, perícitos e matriz extracelular), controlando finamente a passagem de moléculas entre o sangue e o parênquima cerebral para manter a homeostase do SNC (**Figura 5**) (BALLABH; BRAUN; NEDERGAARD, 2004).

Após a isquemia cerebral, a integridade da BHE é comprometida, permitindo a entrada descontrolada de moléculas no parênquima cerebral, levando a formação de edema, o que piora os danos causados pela isquemia (YANG; ROSEMBERG, 2013). Clinicamente, a ruptura da BHE ocorre em mais de um terço dos pacientes com isquemia cerebral e está associada a desfechos desfavoráveis e a menores taxas de sobrevivência após o AVC (ROSEMBERG, 2012) .

Durante o acidente vascular cerebral isquêmico, as células endoteliais microvasculares cerebrais são agredidas por estímulos fisiopatológicos (isto é, espécies reativas de oxigênio (ROS), mediadores inflamatórios), levando à ruptura dos complexos protéicos das *tight junctions* (TJ), com subsequente abertura da barreira e aumento de

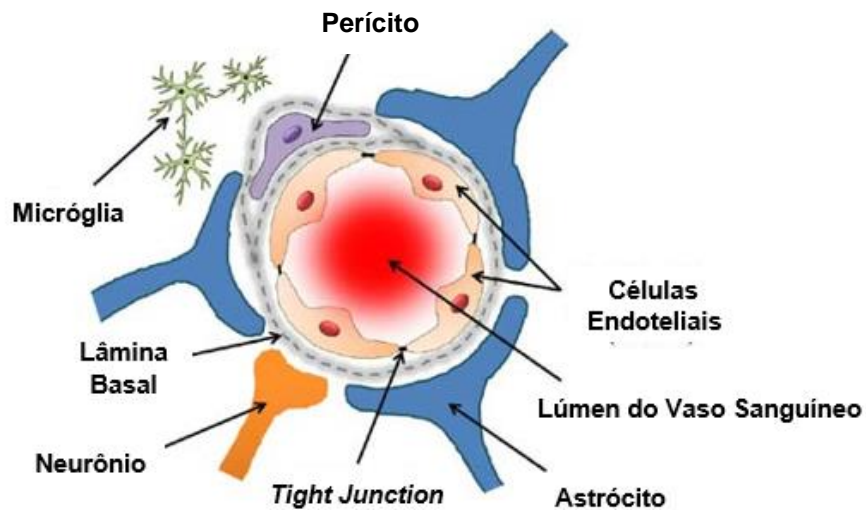
sua permeabilidade. Este processo é clinicamente significativo porque a disfunção da BHE é bem conhecida por contribuir para eventos deletérios após o AVC, como hemorragia intracerebral e edema vasogênico (HALEY; LAWRENCE, 2016).

A isquemia pode afetar todos os componentes da BHE, incluindo células endoteliais, astrócitos, perícitos e a matriz extracelular (PRAKASH; CARMICHAEL, 2015). A perturbação da matriz extracelular afetando componentes de sua estrutura (colágeno tipo IV, proteoglicanos de heparano sulfato, laminina, fibronectina, perlecan) está diretamente envolvida na disfunção aguda da BHE. A ativação de proteinases, incluindo metaloproteinases de matriz (MMPs), é um componente crítico da ruptura precoce da matriz extracelular e subsequente disfunção da barreira no acidente vascular cerebral (RONALDSON; DAVIS, 2012)

Os processos exatos que ocorrem *in vivo* e que permitem que as moléculas transpassem a barreira para o cérebro durante a isquemia não estão totalmente esclarecidos. Em modelos animais de isquemia-reperfusão cerebral, acredita-se que a ruptura da BHE seja bifásica, o que implica em uma primeira abertura precoce 3-6h após um insulto isquêmico, seguida por um período refratário onde a BHE está fechada e então uma segunda abertura 48-72h (HONG et al., 2015).

Como a isquemia cerebral e o dano da barreira hematoencefálica estão intimamente correlacionados, novas abordagens visando diferentes mecanismos para proteger a integridade da permeabilidade da BHE e a redução do dano isquêmico, poderiam ajudar a elucidar o seu mecanismo fisiopatológico, levando ao desenvolvimento de novas terapias mais eficazes para o tratamento do AVC isquêmico.

Figura 5. Estrutura da barreira hematoencefálica (BHE)



Fonte: (SARKAR et al., 2017), adaptado

1.3. Neurogênese: desenvolvimento inicial e neurogênese no cérebro adulto

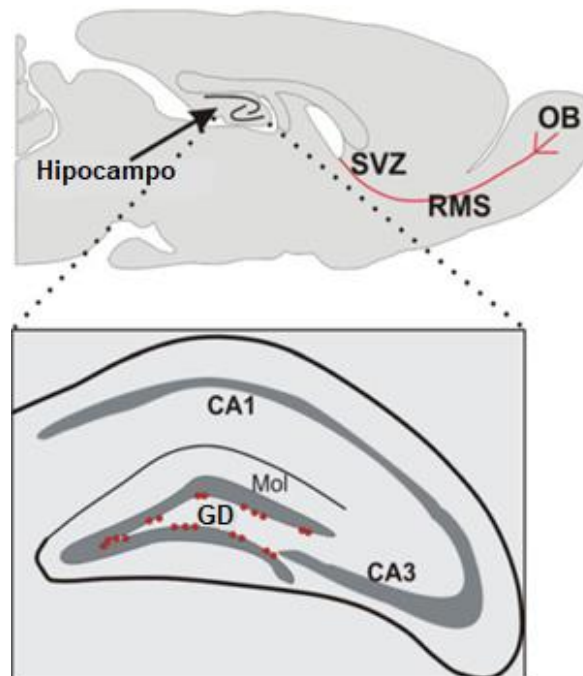
A neurogênese consiste na formação de novas células neurais, e ocorre durante o desenvolvimento inicial para constituir todos os neurônios do sistema nervoso central. Resumidamente, em mamíferos durante o período embrionário, parte do ectoderma se desenvolve em neuroectoderma, e eventualmente dá origem a placa neural na região dorsal do embrião. A placa neural, por sua vez, dobra-se em torno de si própria formando o tubo neural que é preenchido pelo líquido cefalorraquidiano. O tubo neural contém células-tronco neurais, que são células precursoras de todos os neurônios e glia no sistema nervoso central (SNC). Essas células-tronco neurais dividem-se numerosas vezes, passam por processo de diferenciação, migram para os seus sítios finais onde por meio de seus axônios e dendritos formam uma rede sináptica com outros neurônios (DARNELL; GILBERT, 2017).

A comunicação entre os neurônios via contato sináptico permite a criação de circuitos neuronais funcionais. Esses circuitos são a base para processamento sensorial, processamento motor e comportamento. A porção anterior do tubo neural dá origem ao prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Estas três áreas posteriormente dão origem

ainda ao telencéfalo, diencéfalo, metencéfalo e mielencéfalo. O mesencéfalo não se modifica. A medula espinhal e os ventrículos são formados a partir da continuação do canal central sendo preenchidos pelo líquido cefalorraquidiano (LCR) proveniente do telencéfalo (JERNIGAN; STILES, 2017).

Durante anos, a ocorrência de neurogênese no cérebro adulto e a capacidade de gerar novos neurônios tem sido debatida (ALTMAN, 1962; COLUCCI-D'AMATO; BONAVITA; DI PORZIO, 2006). Por muito tempo, acreditava-se que a neurogênese só ocorria durante o período de desenvolvimento embrionário e que este uma vez completo, nenhum novo neurônio poderia ser formado. No entanto, vários estudos forneceram claras evidências de que o processo de neurogênese ocorre continuamente durante a idade adulta em duas áreas específicas: A zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais e zona subgranular (SGZ) do giro denteado (DG) no hipocampo representam dois locais distintos de neurogênese no cérebro adulto (**Figura 6**) (CURTIS et al., 2012; DENNIS et al., 2016)

Figura 6. Processo de neurogênese no cérebro adulto



Fonte: (VON BOHLEN UND HALBACH, 2011), adaptado
Zona subventricular (SVZ), giro denteado (GD), bulbo olfatório (OB), via migração rostral (RMS).

Na neurogênese que ocorre em adultos, são encontradas células-tronco neurais auto-renováveis e multipotentes (NSCs) residentes no cérebro dos mamíferos e são capazes de gerar continuamente novos neurônios. Esses novos neurônios são gerados por NSCs presentes nas regiões da zona SVZ e SGZ do giro denteado do hipocampo, que podem ser estimuladas a migrar para áreas de injúria e então se diferenciar e amadurecer em neurônios funcionais que passarão a integrar circuitos neuronais pré-existentes (SHOHAYEB et al., 2018).

A zona subventricular (SVZ) representa o principal nicho neurogênico germinativo no cérebro de mamíferos adultos. Dentro desta região existem células-tronco neurais auto-renováveis e multipotentes (NSCs) que podem, em última instância, dar origem a novos neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (SANTOS et al., 2012). Na SVZ, as NSCs migram ao longo do fluxo migratório rostral (RMS) e se diferenciam em interneurônios no bulbo olfatório (MU et al., 2010).

O processo de neurogênese que ocorre na SGZ, dá origem a neurônios granulares que se integram a camada granular do GD e a circuitos funcionais do hipocampo (EHNINGER et al., 2008; MU et al., 2010). Este processo ocorre durante o desenvolvimento inicial e ao longo da idade adulta na maioria dos mamíferos. O propósito da neurogênese adulta na SGZ não é bem compreendido, mas existe uma relação entre esse tipo de neurogênese e a aprendizagem e memória espacial (ABROUS; WOJTOWICZ, 2015).

Estudos revelaram que alguns fatores são determinantes para o aumento da neurogênese no cérebro adulto. Estes, podem incluir fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos incluem fatores neurotróficos, fatores de regulação transcricional, citocinas inflamatórias, neurotransmissores e hormônios. Os fatores extrínsecos incluem atividade física, consumo alimentar e transplante de células-tronco (SHOHAYEB et al., 2018).

O processo de neurogênese em adultos é guiado e mediado por várias moléculas-chave de sinalização celular e pelo microambiente em SGZ e SVZ. Como resultado, a taxa de neurogênese é suscetível a aumentos ou diminuições por várias alterações fisiológicas e fisiopatológicas. A proteína de sinalização celular Notch é necessária para manter as células progenitoras neurais, impulsionando a auto renovação (HATAKEYAMA

et al., 2014). Neurotrofinas como o fator de crescimento neural (NGF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) exibem papéis críticos na regulação da neurogênese adulta, assim como a proteína morfogênica óssea e a sinalização Wnt (JOHNSON et al., 2009).

A via de sinalização Wnt influencia a proliferação e diferenciação das NSCs durante o desenvolvimento embrionário. Estudos têm identificado a via de sinalização Wnt como um regulador chave da neurogênese hipocampal adulta (LIE et al., 2005; WEXLER et al., 2009). NSCs no hipocampo adulto expressam vários Wnts, assim como seus receptores correspondentes, e, portanto, recebem sinais Wnt produzidos não apenas de astrócitos, mas também de si mesmos (MU et al., 2010).

Está bem estabelecido que os neurotransmissores influenciam a proliferação e diferenciação de células dentro de zonas neurogênicas. Neurotransmissores como glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), acetilcolina (Ach), dopamina e serotonina (5-HT) medeiam a comunicação neuronal, mas também estão envolvidos na neurogênese adulta, desempenhando papéis importantes na proliferação celular e desenvolvimento sináptico (SIBBE; KULIK, 2017; SONG et al., 2017).

Todos esses componentes do microambiente neurogênico são fundamentais para garantir que a neurogênese no cérebro adulto ocorra corretamente tanto espacial quanto temporalmente, e também implicam em grande importância fisiológica para a regulação desse processo (JOHNSON et al., 2009).

1.3.1. Fases da neurogênese adulta e expressão de marcadores celulares específicos

O processo de neurogênese no SNC é um processo de múltiplos estágios que incluem proliferação, diferenciação, migração, direcionamento e integração sináptica, terminando com a formação de um novo neurônio, funcionalmente integrado pós-mitótico. Vários marcadores são expressos durante estágios específicos da neurogênese adulta e a expressão destes vários marcadores coincide com cada estágio de diferenciação da célula progenitora neural mitótica imatura até o estágio final de diferenciação neuronal, permitindo que o desenvolvimento e o destino das células recém-formadas sejam seguidos de maneira detalhada (VON BOHLEN UND HALBACH, 2011).

A utilização do análogo da timidina bromodeoxiuridina (BrdU) permite que o DNA recém-sintetizado em células que se encontram na fase S da mitose seja marcado e, posteriormente, detectado usando imunohistoquímica. Sendo dessa forma, um marcador de células em proliferação (CURTIS et. al, 2012). BrdU é um nucleosídeo sintético que toma o lugar da timidina durante a replicação do DNA, a sua administração é realizada principalmente por via intraperitoneal por período de tempo e concentrações variadas a depender do desenho experimental (KUHN et al., 2016).

Embora a marcação com BrdU tenha contribuído significativamente para o estabelecimento da neurogênese em duas áreas do cérebro adulto, o SVZ e o SGZ, há algumas limitações quanto ao seu uso neste contexto que precisam ser consideradas para evitar resultados falsos positivos ou negativos. Por exemplo, algumas condições patológicas, como alguma lesão ou AVC, podem romper a barreira hematoencefálica (BHE) e, portanto, aumentar a captação de BrdU. Portanto, o uso da marcação com BrdU para estudar a neurogênese sob tais condições requer cuidados e considerações especiais e o uso de outros indicadores de proliferação de células-tronco e diferenciação neuronal (FARZANEHFAR, 2018).

Além disso, BrdU pode marcar todas as células que estão fase S da mitose no GD adulto, mas essa marcação não faz distinção entre neuroglia e neurônios. Assim, BrdU é usado em conjunto com outros marcadores celulares para identificação de estágios específicos e mudanças no período de tempo da neurogênese adulta (KUHN; COOPER-KUHN, 2007).

No hipocampo adulto, o processo de neurogênese é dividido em cinco estágios e os níveis de expressão de marcadores específicos diferem ao decorrer do desenvolvimento. No estágio inicial, as células-tronco neurais se diferenciam em células progenitoras neurais, que expressam marcadores como proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e nestina (KUHN et al., 2016).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP), pertence ao grupo dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular. No cérebro adulto, GFAP é amplamente conhecida como um marcador de astrócitos maduros. No entanto, uma grande proporção de células recém-diferenciadas na zona SGZ da região do hipocampo também é imunopositiva para GFAP. Recentemente GFAP foi implicada como um marcador

expresso em todas as células progenitoras neurais durante a neurogênese adulta (GARCIA et al., 2004).

Nestina é uma proteína do filamento intermediário tipo VI e se expressa principalmente em células nervosas durante o desenvolvimento dos neurônios para regular o remodelamento celular. Acredita-se que células imunorreativas à nestina estejam envolvidas na neurogênese e se diferenciem em neurônios. Assim, durante o primeiro estágio da neurogênese, as células recém-formadas expressam nestina e GFAP (VON BOHLEN UND HALBACH, 2011).

Durante o segundo estágio, as células amplificadoras transitórias se diferenciam em neurônios imaturos na zona SGZ. As células iniciais desse estágio são positivas para nestina, mas negativas para GFAP (KRONENBERG et al., 2003). No final do estágio dois, as células param de expressar nestina e começam a expressar Double Cortin (DCX) e a molécula de adesão celular neuronal polissialilada (PSA-NCAM), entrando assim no estágio 3 de desenvolvimento (FUKUDA et al., 2003; KRONENBERG et al., 2003).

A DCX é uma proteína associada a microtúbulos que regula a estabilização e agregação da polimerização de microtúbulos. A DCX é encontrada exclusivamente em células precursoras neurais e em neurônios mitóticos imaturos, e é crítica na migração de novos neurônios dentro do fluxo migratório rostral (RMS) (KOIZUMI et al., 2006).

Acredita-se que a expressão de DCX seja exclusiva de novos neurônios, evidenciada pela expressão de BrdU em quase 90% das células positivas para DCX no GD de ratos injetados com BrdU por 12 dias. Além disso, a grande maioria das células que expressam DCX também expressam marcadores precoces de linhagem neuronal, enquanto não possuem a expressão de antígenos neuronais específicos para tipos celulares posteriores (RAO; SHETTY, 2004).

A expressão de DCX complementa a expressão de PSA-NCAM, que é uma molécula de adesão celular neuronal envolvida em plasticidade e aprendizado. PSA-NCAM é mais expresso durante o desenvolvimento inicial do sistema nervoso. No sistema nervoso adulto, o PSA-NCAM é expresso em maiores quantidades em células granulares recém diferenciadas no GD. O objetivo do PSA-NCAM é promover a migração de células precursoras e auxiliar na orientação dos axônios para formar novas sinapses (EL MAAROUF; RUTISHAUSER, 2003; HILDEBRANDT; DITYATEV, 2013). O estágio

três também é chamado de fase de migração e se distingue pelo movimento de neurônios imaturos de SGZ até a camada de células granulares do GD. Esses neurônios continuam expressando PSA-NCAM e DCX (KUHN et al., 2016).

O estágio 4 é a fase de direcionamento axonal e dendrítica, é nesta fase onde os neurônios imaturos mitóticos se tornam neurônios maduros pós-mitóticos. Durante este estágio, as células jovens enviam seus axônios para a camada de células piramidais CA3 do hipocampo e estendem seus dendritos para a camada molecular do GD. No início desta fase, os neurônios imaturos ainda expressam PSA-CAM e DCX, mas à medida em que se diferenciam em neurônios maduros, eles começam a expressar os marcadores calretinina e NeuN (KEMPERMANN et al., 2004; MING; SONG, 2011).

A calretinina é uma proteína de ligação ao cálcio da superfamília da troponina C, e é conhecida como um marcador específico para neurônios GABAérgicos não-piramidais dentro do hipocampo adulto. Esta proteína é mais expressa nos neurônios da retina e nos interneurônios corticais (BARINKA; DRUGA, 2010).

Embora esta proteína seja conhecida devido suas funções no ciclo e sinalização celular e no tamponamento de cálcio, mais recentemente foi observado que a calretinina exibe funções como um modulador da potenciação de longo prazo (LTP) através da regulação da excitabilidade neuronal intrínseca (CAMP; WIJESINGHE, 2009). A expressão de calretinina em células granulares do GD ocorre durante o período em que axônios e dendritos atingem suas sinapses a quais são destinados (MING; SONG, 2011).

Nos estágios finais da neurogênese adulta, os novos neurônios expressam calretinina juntamente com DCX ou NeuN. A expressão de NeuN é observada na maioria dos tipos de células neuronais em todo o sistema nervoso, com exceção de algumas populações neuronais, como as células cerebelares de Purkinje e as células mitrais do bulbo olfatório. NeuN é uma proteína nuclear solúvel localizada no núcleo da célula e no citoplasma dos neurônios maduros pós-mitóticos (LIND et al., 2005) .

A maioria das linhagens celulares neuronais expressa NeuN pós-mitoticamente e, como resultado, a dupla marcação com NeuN/DCX ou NeuN/PSA-NCAM permite a identificação de estágios mitóticos iniciais versus populações de neurônios pós-mitóticos tardios (VON BOHLEN; HALBACH, 2011).

À medida que os neurônios pós-mitóticos progridem para o estágio 5, os contatos sinápticos começam a serem formados. Os neurônios substituem a expressão de calretinina por calbindina à medida que amadurecem em células granulares (BRANDT et al., 2003). A calbindina é uma proteína de ligação ao cálcio semelhante à calretinina, e sua expressão marca o início da sinaptogênese hipocampal. Na qual a medida que os neurônios recém formados expressando esse marcador se integram sinapticamente ao hipocampo, onde circuitos funcionais são criados entre a região hipocampal CA3 e o córtex entorrinal (VAN PRAAG et al., 2002).

Assim, esse estágio final também é chamado de fase de integração sináptica. Os neurônios completamente maduros neste estágio expressam o marcador pós-mitótico para neurônios NeuN (KUHN et al., 2016).

1.3.2. Neurogênese em resposta ao AVC isquêmico

O processo de neurogênese pode ser desencadeado por meio de alterações fisiopatológicas provocadas por uma lesão isquêmica ou trauma no cérebro adulto. O AVC isquêmico leva a uma resposta regenerativa na área de peri-infarto resultando no aumento do número de NPCs na zona SVZ dos ventrículos laterais e SGZ do giro denteado do hipocampo (KERNIE; PARENT, 2010).

A lesão isquêmica induz neurogênese nessas áreas promovendo sinalização e migração de neuroblastos, guiados por vasos sanguíneos, para a área isquêmica lesada, o que favorece a recuperação funcional e histológica no cérebro danificado pela isquemia através da proliferação, migração e integração de células neurais recém-formadas a um circuito neural existente (MOLINA-HOLGADO; MOLINA-HOLGADO, 2010b).

Estudos que utilizaram modelos experimentais de isquemia-reperfusão cerebral em roedores indicam que a isquemia focal estimula significativamente a proliferação celular e neurogênese na zona SVZ após a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) em ratos (PARENT et al., 2002). Potenciais mediadores de proliferação celular e neurogênese induzida por lesão isquêmica têm sido identificados. Dentre eles, está a via de sinalização Notch, particularmente através de Notch1, que estimula a proliferação de células SVZ e a neurogênese após isquemia cerebral (WANG et al., 2009).

Os neuroblastos da SVZ são normalmente destinados a migrar para o bulbo olfatório através do fluxo migratório rostral. Após isquemia focal, no entanto, muitas destas células migram em cadeias para a região do estriado isquêmico. Diversos fatores moleculares que direcionam essa migração ectópica para as regiões de peri-infarto foram identificados. Estes incluem metaloproteinases de matriz e interações entre quimiocinas e seus receptores (KERNIE; PARENT, 2010).

Embora um grande número de neuroblastos alcancem as regiões de lesão no estriado após o AVC, poucos destes se diferenciam em neurônios maduros. A maioria destes parecem morrer, talvez devido a uma falha na integração ou devido ao ambiente inflamatório. Os neurônios remanescentes diferenciados que se integrem à área de dano, exercem uma influência trófica positiva no microambiente isquêmico para promover a sua recuperação (OHAB et al., 2006).

A neurogênese como resposta reparadora endógena devido dano promovido pela isquemia cerebral foi demonstrada tanto em humanos como em animais (LIU et al., 2015; RUAN et al., 2014). O AVC isquêmico leva à morte celular das áreas cerebrais afetadas, ao mesmo tempo que estimula uma resposta neuroregenerativa em regiões teciduais nas proximidades da área isquêmica, onde a quantidade de neurogênese presente no estriado lesionado é aumentada juntamente com a proliferação e recrutamento de neuroblastos provenientes da zona SVZ (OHAB et al., 2006).

A capacidade neuroregenerativa pode continuar por dias ou semanas após o dano isquêmico, portanto o aumento da neurogênese endógena pode se constituir como uma segunda janela de tratamento (SAHOTA; SAVITZ, 2011). Como resultado, a modulação dessas vias regenerativas endógenas para favorecer a regeneração do tecido cerebral lesionado pode fornecer novas terapias para a recuperação neurológica após lesões cerebrais, como a provocada pelo AVC isquêmico e seu tratamento tardio.

1.4. Tratamento atual do AVC isquêmico

As opções terapêuticas na fase aguda do AVC isquêmico são limitadas, sendo a droga de escolha o ativador do plasminogênio tecidual (tPA). Nos Estados Unidos o tPA é a única droga aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do AVC isquêmico. TPA é uma droga de ação tromboembólica a qual promove a conversão proteolítica do plasminogênio na protease ativa plasmina, que por sua vez é essencial para a lise do coágulo, de forma a restabelecer o fluxo sanguíneo para a área isquêmica, melhorando a evolução neurológica dos pacientes acometidos (JIN et al., 2018).

Embora o tPA seja o tratamento efetivo padrão do AVC isquêmico agudo na prática clínica, uma série de limitações estão associadas à sua utilização. Essas limitações incluem: uma janela terapêutica curta de aproximadamente 4,5 horas após o surgimento dos sintomas, complexidade de administração, aumento do risco de transformação hemorrágica, restauração incompleta do fluxo sanguíneo e neurotoxicidade (CHENG; KIM, 2015; HIRANO, 2015). O tratamento tardio com tPA é acompanhado pela degradação dos componentes da matriz extracelular e pelo aumento da permeabilidade da BHE, além de promover transformação hemorrágica (CHEN et al., 2018).

Além do método de trombólise por meio da administração do tPA, métodos cirúrgicos podem ser utilizados em alguns casos para tentar remover trombos ou êmbolos dos vasos ocluídos. O procedimento cirúrgico é denominado trombectomia ou embolectomia, onde um dispositivo cirúrgico é utilizado para remover a oclusão intra-arterial e permitir a reperfusão da área isquêmica. A trombectomia mecânica com ou sem trombólise intravenosa é indicada no tratamento agudo dos pacientes com AVC isquêmico causado pela oclusão de grandes vasos que não respondem ou não são elegíveis ao tratamento com tPA em até 6 horas após o início dos sintomas (FJETLAND; ROY, 2018; VIDALE et al., 2018).

A necessidade de agentes alternativos para o tratamento do AVC isquêmico agudo é exemplificada por estudos que mostram que apenas 3-5% dos pacientes acometidos são elegíveis para o tratamento por meio da administração do tPA (0.9 mg/Kg) intravenoso e os 95% restantes destes não recebem tratamento específico. Além disso, mesmo com a administração de tPA, apenas cerca de 15% dos pacientes têm

recuperação completa e até 3% apresentam hemorragia intracraniana fatal ou não fatal. (CHEN et al., 2018; DONNAN et al., 2011).

A trombectomia endovascular é o tratamento padrão para pacientes com AVC isquêmico agudo secundário à oclusão da circulação anterior de grandes vasos que se apresentam dentro de até 24 horas após o início dos sintomas. No entanto, apenas cerca de 20% dos pacientes apresentam oclusão de grandes vasos e a realização do procedimento cirúrgico dentro de um prazo hábil se constitui como um desafio porque este só pode ser realizado em centros altamente especializados (HENDERSON; WEITZ; KIM, 2018).

Até o momento nenhum fármaco foi estabelecido como eficaz ou como substituto para o tPA, e sabendo-se que a melhora das funções neurológicas está diretamente associada com a restituição do fluxo sanguíneo para a área isquêmica e consequente redução da área de infarto cerebral (IRVINE et al., 2017), o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento do AVC isquêmico é essencial. Neste sentido, estudos com animais que investigam os mecanismos e a eficácia de novos agentes terapêuticos, considerando diferentes fatores de risco para essa condição é de grande importância.

1.5. Ácidos graxos ômega-3: ácido docosahexaenoico (DHA)

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são classificados principalmente em dois grupos: ômega-3, ômega-6 e ômega-9. Os PUFAs ômega-3 (também conhecidos como ácidos graxos n-3 ou “óleo de peixe”) são macronutrientes essenciais e devem ser obtidos de fontes alimentares porque o corpo humano não pode sintetizá-los efetivamente. Os principais tipos de PUFAs ômega-3 são o ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5, n-3), ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6, n-3) e o precursor destes o ácido alfa-linolênico (ALA; 18:3, n-3) (CRUPI; MARINO; CUZZOCREA, 2013).

EPA e DHA são encontrados principalmente em peixes gordurosos de águas frias, como salmão, sardinhas e atum. Fontes de ALA incluem semente de linho, canola, soja, nozes e vegetais verdes folhosos. O interesse por parte de pesquisadores a respeito dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 tem aumentado significativamente nos últimos

anos por causa de seus vários papéis na promoção da saúde e na redução do risco de doenças (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018).

Estudos mostram que para o desenvolvimento de um sistema nervoso saudável e totalmente funcional, a suplementação e a utilização de ácidos graxos ômega-3 são fundamentais. Evidências crescentes têm apoiando os efeitos benéficos de uma ingestão aumentada de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 em uma variedade de condições neurodegenerativas e neurológicas. Uma série de estudos de revisão discutiram os efeitos complementares e divergentes dos diferentes PUFAs ômega-3, tanto no nível fundamental em termos de sinalização e função celular como também em doenças como câncer, resistência à insulina e doenças cardiovasculares (DYALL, 2015).

DHA é sintetizado a partir de ALA via alongamento e dessaturação no fígado. No entanto, a quantidade de ALA fornecida pela dieta não é suficiente para atender aos requisitos do sistema nervoso em desenvolvimento; portanto, a suplementação dietética de DHA é necessária para atender a essas demandas. O suprimento de DHA do corpo é derivado da dieta principalmente através da ingestão de peixes de água fria e/ou algas. Esse ácido graxo é então metabolizado pelo fígado e biossintetizado em fosfolipídios que serão dispersos nas membranas do SNC (HASHIMOTO et al., 2017).

Este ácido graxo possui potentes efeitos anti-inflamatórios, e como a inflamação é a base de muitas doenças crônicas, o tratamento com DHA tem sido amplamente demonstrado como tendo efeitos benéficos em pacientes com doença coronariana, asma, artrite reumatoide, osteoporose, sepse, câncer, doença do olho seco e degeneração macular relacionada à idade (SIMOPOULOS, 2008).

DHA é predominantemente encontrado nos fosfolipídios de membrana do sistema nervoso central, principalmente na retina. Estando envolvido no desenvolvimento do cérebro e da retina, no processo de envelhecimento, formação da memória, função da membrana sináptica, assim como na biogênese e função dos fotorreceptores e na neuroproteção. DHA é quantitativamente o mais importante ácido graxo poli-insaturado ômega-3 no cérebro compreendendo 10-20% da composição total de ácidos graxos, enquanto que os PUFAs n-3 ALA, EPA e o ácido docosapentaenoico correspondem apenas 1% (BAZAN; MOLINA; GORDON, 2011; BELAYEV et al., 2015; EADY et al., 2012).

DHA também é componente crítico de mecanismos endógenos que protegem o cérebro após lesão e está associado à estabilidade da membrana neuronal e às funções de neurotransmissão mediada pelos neurotransmissores serotonina e dopamina, que podem se relacionar com etiologia do humor e às manifestações cognitivas da depressão (BAZAN; CALANDRIA; GORDON, 2013; DYALL, 2015). DHA é bem conhecido como um robusto agente neuroprotetor em modelos de isquemia-reperfusão cerebral focal. Recentemente, foi demonstrado que este agente melhora significativamente as funções neurocomportamentais, diminui o volume do infarto, promove a sobrevivência celular na penumbra isquêmica, assim como, reduz o edema cerebral em uma semana após isquemia-reperfusão cerebral focal em ratos. Além disso, a janela terapêutica mostra que o DHA é neuroprotetor quando administrado até 5h após início da isquemia, em um período experimental de 7 dias (BELAYEV et al., 2011; EADY et al., 2012).

Outros estudos mostraram ainda que a suplementação com EPA e DHA aumentou a neurogênese no hipocampo de ratos idosos e estimulou eventos imediatos de neurogênese precoce que promoveram a diferenciação neuronal aumentando a população de neurônios com dendritos mais longos (DYALL, 2015; DYALL; MICHAEL; MICHAEL-TITUS, 2010). DHA estimula o crescimento neurítico de neurônios hipocâmpais e promove a manutenção de ambas células tronco progenitoras neurais gliogênicas e neurogênicas (CALDERON; KIM, 2004; SAKAYORI et al., 2011).

Em condições fisiológicas normais, DHA em sua maior parte é encontrado esterificado em fosfolipídios de membrana. No entanto, durante situações de injúria é liberado dos fosfolipídios da membrana em um ritmo acelerado devido a ocorrência de eventos metabólicos. Um desses eventos metabólicos críticos é a ativação da fosfolipase A2 (PLA2), resultando na hidrólise dos fosfolipídios da membrana e na liberação de ácidos graxos livres, incluindo o ácido araquidônico, um precursor para importantes eicosanoides de sinalização celular (ADIBHATLA; HATCHER, 2008). Mediante eventos neurotraumáticos, como convulsões ou isquemia/reperfusão cerebral, o DHA em sua forma livre e o ácido araquidônico se acumulam após serem liberados de suas posições esterificadas (BAZAN; MOLINA; GORDON, 2011).

A partir deste *pool* de DHA livre, DHA atua como precursor de mediadores bioativos, denominados docosanoides. Durante a isquemia-reperfusão DHA é convertido

em neuroprotectina D1 (NPD1; 10R, 17S-di-hidroxi-docosa-4Z, 7Z, 11E, 15E, 19Z ácido hexaenoico). NPD1 é um docosanoide bioativo sintetizado em resposta ao estresse oxidativo, citocinas e neurotrofinas produzidas como resultado da injúria isquêmica (BAZAN, 2009a).

1.6. Docosanoídes: neuroprotectina D1 (NPD1) e neuroproteção

A isquemia cerebral é caracterizada por um rápido acúmulo (em poucos minutos) de ácidos graxos livres, incluindo ácido araquidônico (AA; 20: 4, n-6) e DHA (22: 6, n-3), devido ao aumento do cálcio intracelular e ativação de fosfolipases. Este grupo composto por AA e DHA em suas formas livres é então convertido através de processos enzimáticos, como a peroxidação lipídica mediada por radicais livres, em uma cascata de mediadores pró e anti-inflamatórios, que podem promover a sobrevivência celular ou induzir a morte celular programada (MURALIKRISHNA ADIBHATLA; HATCHER, 2006; UGIDOS et al., 2017).

Durante isquemia-reperfusão, o DHA livre (não-esterificado) é convertido em mediadores lipídicos bioativos que possuem potente ação anti-inflamatória, imunoreguladora e de pró-resolução denominados docosanoídes, como NPD1, resolvinas D1-D5 e maresinas (SERHAN et al., 2015). Especificamente, após hidrólise, o DHA é convertido no mediador estereoespecífico neuroprotectina D1 (NPD1) através série de reações que começa com a lipoxigenação mediada pela 15-lipoxigenase-1 (15-LOX-1) seguida por reações de epoxidação e hidrólise (Figura 7) (MARCHESELLI et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2004).

O NPD1 é o primeiro membro identificado deste grupo de mediadores lipídicos. NPD1 inibe a expressão gênica pró-inflamatória induzida pelo estresse oxidativo e promove sobrevivência celular tanto in vitro como in vivo (BAZAN; CALANDRIA; GORDON, 2013). A identificação de NPD1 como um docosanoide neuroprotetor na isquemia-reperfusão cerebral, bem como em células neurais expostas ao estresse oxidativo, revelou um importante evento considerado chave na sinalização para a sobrevivência celular, promovendo neuroproteção (MARCHESELLI et al., 2003).

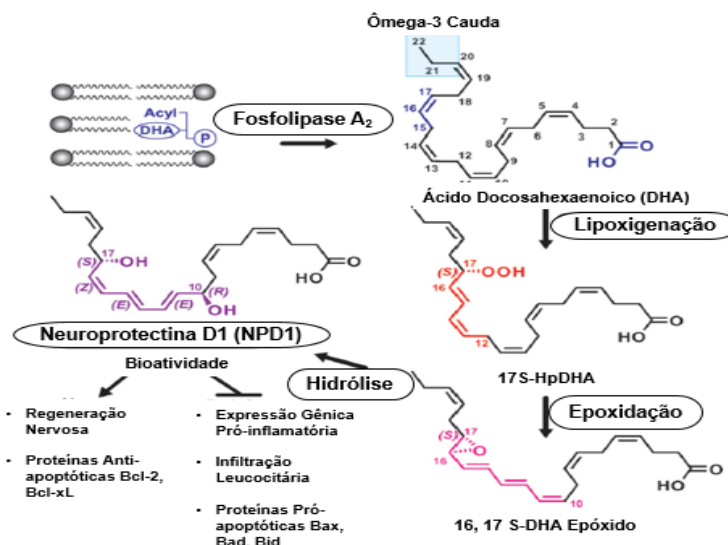
O NPD1 é um mediador lipídico pleiotrópico que possui importantes efeitos pró-sobrevivência celular, anti-apoptóticos e anti-inflamatórios. NPD1 inibe apoptose,

infiltração leucocitária, por meio da regulação da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios, atenuando a formação de edema e modulando a expressão gênica de proteínas pró e anti-apoptóticas promovendo a sobrevivência neuronal (BAZAN, 2009a; SERHAN et al., 2011).

A síntese de NPD1 é desencadeada por estresse oxidativo e/ou atuação de neurotrofinas. O conceito atual é que os docosanoides derivados do DHA acionam um processo de sinalização endógena para proteger e sustentar a integridade sináptica, assim como de todo o circuito neuronal (BAZAN, 2005). O efeito neuroprotetor de NPD1 inclui a regulação positiva da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e Bfl-1/A1 e a regulação negativa da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax, Bad e Bid. Além disso, NPD1 inibe a ativação da caspase-3 induzida pelo estresse oxidativo assim como a expressão da COX-2 e a ativação do fator nuclear kappa beta (NF- κ β) induzida pela isquemia-reperfusão (ASATRYAN; BAZAN, 2017).

A bioatividade de NPD1 demonstra que o DHA não é apenas um alvo da peroxidação lipídica, mas também é o precursor de uma resposta sinalizadora neuroprotetora à isquemia-reperfusão, abrindo assim novos caminhos para investigação terapêutica do AVC isquêmico, neurotrauma, lesão medular e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, com o objetivo de regular esta nova via de sinalização de sobrevivência celular.

Figura 7. Biossíntese da neuroprotectina D1 (NPD1)



Fonte: (BAZAN, 2009a), adaptado

2. JUSTIFICATIVA

Acidente vascular cerebral isquêmico é a quinta principal causa de morte nos EUA e a principal causa de incapacidade a longo prazo (BELAYEV et al., 2018). O AVC isquêmico representa a segunda causa de morte no mundo, levando cerca de 6,7 milhões de pessoas à óbito nos últimos anos. Conforme a Organização Mundial de Saúde, no Brasil são registradas cerca de 68 mil mortes por AVC anualmente. A doença representa a terceira causa de morte e de incapacitação no país, o que gera grande impacto econômico e social, levando a maiores gastos no sistema público de saúde com altas taxas de mortalidade e morbidade (NAGHAVI et al., 2015).

As opções terapêuticas para o tratamento do AVC isquêmico agudo são restritas e visam principalmente o restabelecimento do fluxo sanguíneo por meio da utilização de agentes trombolíticos, sendo seu uso limitado devido à janela de tempo efetiva desses agentes de aproximadamente 4,5h após o início dos sintomas (SEKERDAG; SOLAROGLU; GURSOY-OZDEMIR, 2018). Atualmente apenas uma terapia aprovada pelo FDA está disponível para o seu tratamento, sendo esta o ativador do plasminogênio tecidual (tPA). Embora o tPA seja o tratamento efetivo padrão do AVC isquêmico agudo na prática clínica, apenas 3-5% dos pacientes acometidos são elegíveis para o tratamento e uma série de limitações estão associadas à sua utilização (CHEN et al., 2018; CHENG; KIM, 2015; HIRANO, 2015).

Portanto, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento do AVC isquêmico é essencial. Neste sentido, estudos com animais que investigam os mecanismos e a eficácia de novos agentes farmacológicos, considerando diferentes fatores de risco para essa condição é de grande importância.

O ácido docosahexaenoico (DHA) é um ácido graxo pertencente à família ômega-3, e é predominantemente encontrado nos fosfolipídios de membrana do sistema nervoso central, principalmente na retina. Este ácido graxo está diretamente envolvido no desenvolvimento do cérebro e da retina, no processo de envelhecimento, formação da memória, função da membrana sináptica, assim como na biogênese e função dos fotorreceptores e na neuroproteção (BAZAN; MOLINA; GORDON, 2011). DHA é bem conhecido como um robusto agente neuroprotetor em modelos de isquemia-reperfusão cerebral focal e é o precursor de mediadores bioativos denominados docosanoides,

dentre eles a neuroprotectina D1 (NPD1). NPD1 é um mediador lipídico pleiotrópico que possui importantes efeitos pró-sobrevivência celular, anti-apoptóticos, anti-inflamatórios e neuroprotetores (BAZAN, 2009a; BELAYEV et al., 2011).

Embora as atividades neuroprotetoras do DHA tenham sido previamente demonstradas, seus mecanismos neuroprotetores e neurorestauradores assim como o efeito da administração direta do seu metabólito bioativo NPD1 em um modelo de isquemia-reperfusão cerebral focal experimental ainda não foram completamente caracterizados.

A isquemia cerebral induz um aumento da neurogênese e angiogênese endógena, o qual se acredita ser um processo inato de recuperação neurológica (MOGOANTĂ et al., 2010; RUAN et al., 2015). Neste contexto, pesquisas experimentais que busquem elucidar os mecanismos subjacentes dessa associação assim como a sua modulação, poderão fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas terapias neurorestauradoras para o tratamento do AVC isquêmico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar os efeitos e mecanismos neuroprotetores e neurorestauradores mediados pelo DHA e NPD1 sobre a neurogênese, angiogênese, barreira hematoencefálica e na área de penumbra isquêmica num modelo de isquemia-reperfusão cerebral focal em ratos.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar os efeitos e mecanismos neuroprotetores do DHA sobre a neurogênese no período experimental de 2 semanas após isquemia-reperfusão através da avaliação neurocomportamental, histopatológica e imunexpressão dos marcadores celulares BrdU, Ki-67, DCX e NeuN.
- Analisar os efeitos do DHA sobre a síntese de NPD1 na área de penumbra isquêmica na 4^a e 5^a h após isquemia-reperfusão por meio de análise lipidômica, cromatografia líquida e espectrometria de massa e análise neurocomportamental.
- Analisar os efeitos e mecanismos neuroprotetores do DHA sobre a neuroinflamação e apoptose durante o período experimental de 4 semanas após isquemia-reperfusão através da avaliação neurocomportamental, histopatológica e imunexpressão dos marcadores celulares NeuN, GFAP, Iba-1, DCX e coloração fluorescente por Hoechst 33342.
- Analisar o efeito da administração de NPD1 sobre a área de penumbra isquêmica 7 dias após isquemia-reperfusão por meio de imageamento por ressonância magnética, análise histopatológica e avaliação neurocomportamental.
- Analisar o efeito de NPD1 sobre o dano a barreira hematoencefálica e ruptura da unidade neurovascular, angiogênese e densidade axonal 7 dias após isquemia-reperfusão por meio da imunodeteção da infiltração de IgG no parênquima cerebral e imunexpressão do marcador celular SMI-71 e da proteína pGAP-43.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratos adultos machos *Sprague-Dawley* (SD, 280-320g) provenientes do laboratório Charles River (Wilmington, MA) e mantidos no biotério da Universidade Estadual da Louisiana com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo de 12 horas claro/escuro, em microisoladores individuais em racks com sistema automático de ventilação e filtragem de ar e submetidos a rigoroso controle sanitário com livre acesso à água e ração. Antes do procedimento cirúrgico experimental, os animais eram submetidos a jejum *overnight* com livre acesso a água. Todos os ensaios experimentais foram realizados em conformidade com as diretrizes descritas no Guia para o Cuidado e Uso de Animais Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA e foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais (IACUC) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual da Louisiana (LSUHSC), Nova Orleans, EUA sob o número de protocolo IACUC#3239 (Anexo I).

4.2. Modelo experimental

4.2.1. Anestesia e preparo para procedimento cirúrgico

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados através da inalação de uma combinação de gases composta na seguinte proporção: 3% isoflurano, 70% N₂O e 30% O₂. Após indução da anestesia, a mesma era então mantida com 1% de isoflurano na mesma mistura de gases.

Os animais foram oralmente intubados e mecanicamente ventilados após administração de brometo de pancurônio (Pavulon®) (0,6 mg/Kg, i.v.) e sulfato de atropina (USP) (0,5 mg/kg i.p.) para imobilização e diminuição das secreções traqueais. Cateteres foram então cirurgicamente implantados na artéria e veia femoral direita para obtenção de amostras sanguíneas e administração de fármacos. Análises seriadas de gasometria, glicose plasmática, monitoramento da frequência cardíaca e pressão arterial antes, durante e depois do procedimento cirúrgico foram realizadas. Temperatura retal

(CMA/150 *Temperature Controller*, CMA/Microdiálise AB, Estocolmo, Suécia) e temperatura craniana (músculo temporal; Omega Engineering, Stamford, CT) foram rigorosamente monitoradas antes, durante e após o procedimento cirúrgico (**Figura 8**).

Figura 8. Preparação para o procedimento cirúrgico de oclusão da artéria cerebral média (MCAo) em ratos



Fonte: (BELAYEV; ENDRES; PRINZ, 2010), adaptado

(A) (1) sistema de anestesia inalatória por isoflurano; (2) respirador mecânico; (3) sistema de exaustão de isoflurano; (4) controlador de temperatura retal com termômetro e almofada de aquecimento; (5) controlador de temperatura craniana com sonda de aferição; (6) iluminador de fibra óptica; (7) lupa com lâmpada fluorescente. (B) Animal intubado e posicionado na mesa cirúrgica

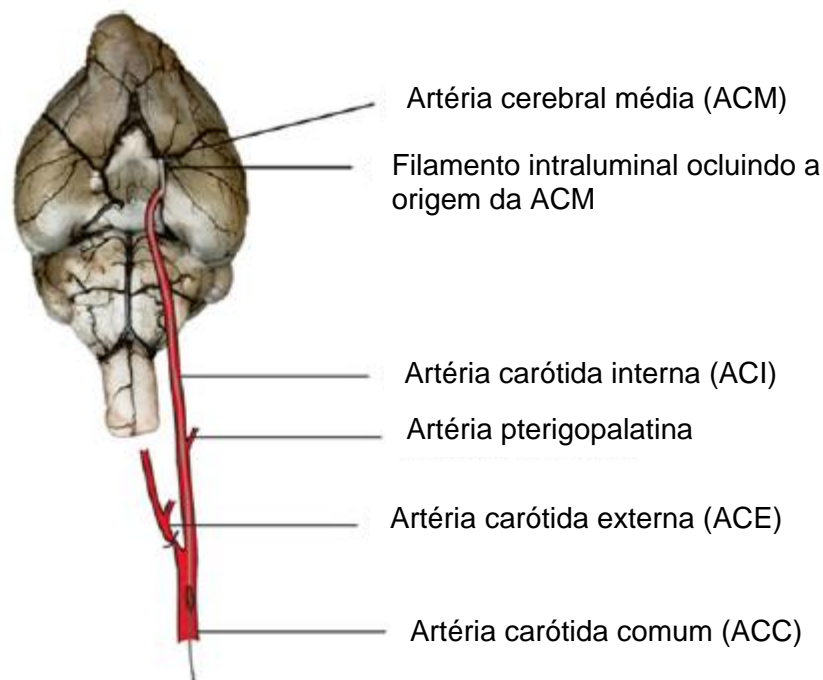
4.2.2. *Preparo do fio de sutura para oclusão da artéria cerebral média*

Um fio de sutura de nylon monofilamentar 3-0 (Harvard Apparatus®, South Natick, MA) foi dividido em segmentos medindo 4 cm de comprimento e tiveram uma de suas extremidades distais arredondadas por meio de aquecimento próximo uma chama e então revestidos com solução de poli-L-lisina (0,1% (p/v), em água deionizada, Sigma-Aldrich®) (exposição \approx 10 s) e secos em estufa a 60°C por 1 h. O diâmetro dos fios de oclusão não mudou durante o processo de revestimento, sendo os mesmos preparados diariamente e armazenados em temperatura ambiente (18–26 °C) e utilizados dentro de um prazo máximo de 2 a 3 horas (BELAYEV et al., 1996).

4.2.3. Oclusão da artéria cerebral média (MCAo)

Os animais deste estudo tiveram a artéria cerebral média (ACM) direita ocluída por filamento intraluminal revestido com poli-L-lisina, conforme descrito e padronizado anteriormente (BELAYEV et al., 1996). O procedimento consiste em inserir um fio de nylon na artéria carótida interna (ACI) e, em seguida, avançá-lo intracranialmente para bloquear o fluxo sanguíneo da ACM (**Figura 9**).

Figura 9. Oclusão da artéria cerebral média (MCAo) por filamento intraluminal

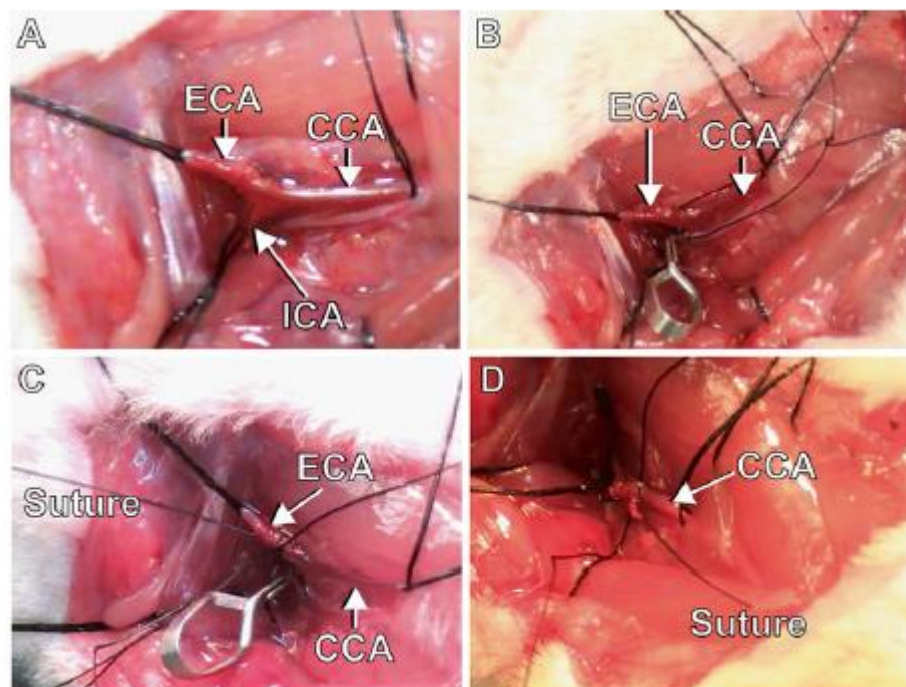


Fonte: (BELAYEV; ENDRES; PRINZ, 2010), adaptado

Resumidamente, após anestesia e tricotomia da área cirúrgica, uma incisão na linha média da superfície ventral do pescoço foi feita e a artéria carótida comum direita (ACC) foi exposta. A ACC direita foi então completamente isolada e dissecada do tecido circundante e nervos adjacentes até a bifurcação das artérias carótidas externa (ACE) e interna (ACI). Os ramos occipitais da ACE e da artéria pterigopalatina foram identificados e coagulados. Um fio de sutura monofilamentar de nylon 3-0 de 4 cm revestido com poli-L-lisina foi introduzido pela ACE dentro da ACI artéria e avançado intracranialmente dentro do polígono de Willis ocluindo a origem ACM (**Figura 10**).

A posição correta do fio foi confirmada pela sensação de resistência durante a sua introdução ou pelo avanço de uma distância definida de acordo com o peso corporal do animal (270–300g - 18–20 mm; 310–330g - 20–22mm; 340g até 23-25 mm) da bifurcação ACC. A sutura foi fixada a CCE por sutura intraluminal para reduzir o sangramento. Em seguida, a incisão no pescoço foi fechada por cliques microcirúrgicos e os animais foram acordados da anestesia e devolvidos às suas caixas.

Figura 10. Procedimento cirúrgico de oclusão da artéria cerebral média (MCAo) em ratos



Fonte: (BELAYEV; ENDRES; PRINZ, 2010)

Procedimentos cirúrgicos: (A) dissecação da CCA, ECA e ICA do tecido e nervos circundantes; (B) clipe microvascular colocado na ICA; (C) pequena incisão feita na ECA entre as duas ligaduras e o fio de sutura foi introduzido e avançado na bifurcação CCA. (D) O clipe microvascular foi removido e o fio de sutura foi avançado na ICA e MCA. Abreviaturas: artéria carótida comum CCA, artéria carótida externa ECA, artéria carótida interna ICA, artéria cerebral média MCA, *suture*, fio de sutura.

Após 60 min de MCAo, os animais foram testados em uma bateria de testes neurocomportamentais padronizada para confirmar a presença inicial de um déficit neurológico consistente, na qual eram atribuídos escores onde 0 = normal e 12 = déficit total máximo. Nesse ponto, os animais que não apresentavam hemiparesia da extremidade contralateral frontal foram excluídos do estudo. Apenas animais com elevado escore (10 ou mais) foram utilizados.

Após 2 horas de MCAo, os animais foram re-anestesiados utilizando-se a mesma combinação prévia de gases e a incisão cirúrgica foi reaberta. O fio de sutura que ocluía a ACM foi então cuidadosamente removido permitindo a reperfusão. A ACC e o ACI foram avaliadas de forma a verificar e garantir o retorno de boas pulsações. A incisão foi então fechada por meio de sutura com fios de seda e os animais foram acordados da anestesia e retornaram para as suas caixas. Os animais foram mantidos vivos, de acordo com cada protocolo experimental, com livre acesso à água e comida. O peso corporal e a temperatura retal foram monitorados e registrados diariamente até o dia da eutanásia.

4.3. Testes neurocomportamentais

Todos os animais foram avaliados por uma bateria de testes neurocomportamentais padronizada (BELAYEV et al., 1996) para avaliação e detecção de déficit neurológico, assim como, a sua evolução. A bateria era composta por dois testes: Teste de avaliação neurocomportamental do reflexo postural (*postural reflex test*) e o teste de avaliação da resposta de membros anteriores induzidos (*Placing test*). A função neurológica foi graduada em uma escala de 0 a 12 (escore normal = 0; somatório total; déficit máximo = 12) (**Tabela 1**). Apenas animais com elevado escore foram utilizados. Ratos apresentando convulsões ou distúrbios contínuos de consciência foram excluídos do estudo. Todos os testes foram realizados por um investigador de maneira cega.

Tabela 1. Distribuição dos escores neurológicos dos testes neurocomportamentais

Teste	Escore Normal	Déficit Máximo
Reflexo Postural*	0	2
Resposta de Membros Anteriores Induzidos†		
Resposta Visual		
Frontal	0	2
Lateral	0	2
Resposta Tátil		
Dorsal	0	2
Lateral	0	2
Reflexo Proprioceptivo	0	2
Total	0	12

Fonte: (BELAYEV et al., 1996)

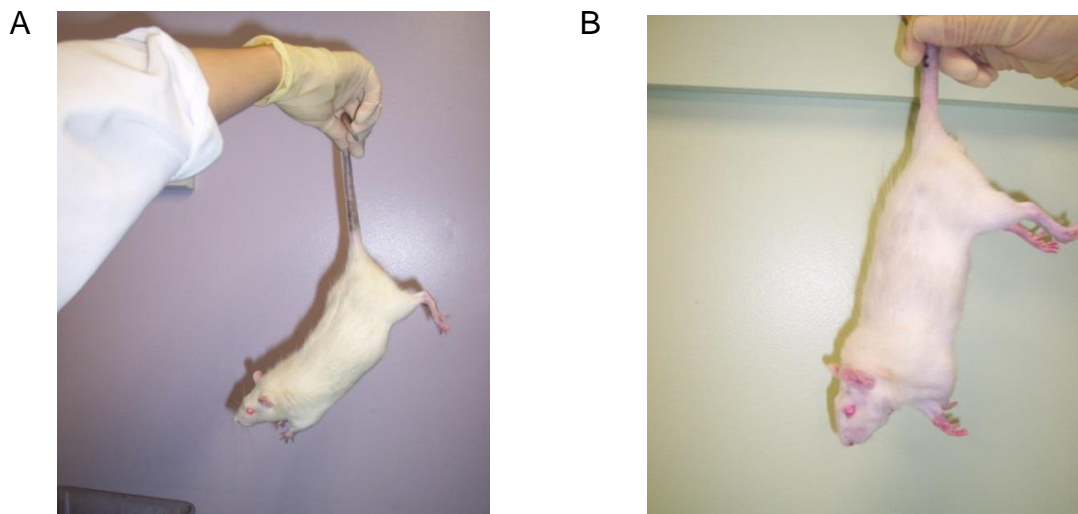
Escores*: 0 = Ausência de déficit observável; 1 = Discreta resposta de flexão de membro mediante suspensão da cauda; 2 = Ausência total de resposta, déficit consistente visível.

Escores†: 0 = Colocação completa imediata da pata sobre a superfície; 1= colocação incompleta e/ou atrasada (<2 s); 2 = Ausência de colocação da pata e reflexo de movimento.

4.3.1 Teste de Avaliação neurocomportamental do Reflexo Postural (*Postural reflex*)

Este teste foi utilizado para examinar a parte superior e anterior da postura, em resposta a suspensão da cauda e ao deslocamento lateral, e é considerado sensível às lesões corticais e estriatais (**Figura 11**). Os escores atribuídos nesse teste, variaram de 0 a 2. Onde 0 = ausência de déficit observável; 1 = Discreta resposta de flexão de membro frontal lateral mediante suspensão da cauda; 2 = ausência total de resposta, déficit consistente.

Figura 11. Avaliação neurocomportamental do reflexo postural



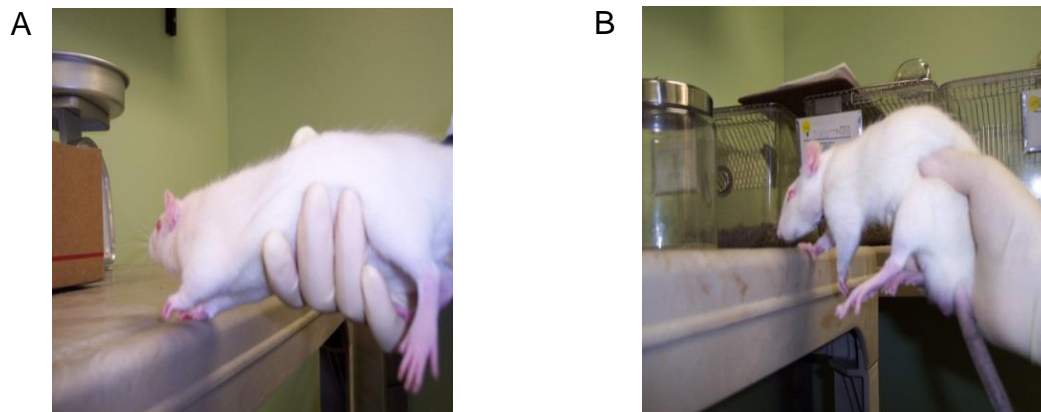
Fonte: Elaborada pelo autor

(A) reflexo postural normal antes da MCAo; (B) reflexo postural após MCAo

4.3.2 Teste de resposta de membros anteriores induzidos (*Placing test*)

Este teste foi utilizado para avaliar a integração sensório-motora, avaliando as respostas dos membros anteriores frente a estímulos visuais, táteis e proprioceptivos (Figura 12). Os escores atribuídos nesse teste, variavam de 0 a 2. Onde 0 = Colocação completa e imediata da pata sobre a superfície; 1 = Colocação incompleta e/ou atrasada (<2 segundos); 2 = Ausência total de resposta e reflexo de movimento da pata.

Figura 12. Avaliação neurocomportamental da resposta de membros anteriores induzidos



Fonte: Elaborada pelo autor

(A) resposta normal antes da MCAo; (B) resposta após MCAo

4.4. Grupos experimentais e tratamentos

Os animais foram divididos randomicamente em quatro grupos experimentais: DHA, salina, NPD1 e CSF. O grupo DHA recebeu DHA (Cayman®, Ann Arbor, MI) na dose de 5mg/Kg, diluído em solução salina 0,9% por via intravenosa (i.v.), administrado na veia femoral direita. O grupo salina recebeu apenas salina 0,9% i.v. em um volume semelhante ao grupo DHA.

O grupo NPD1 foi tratado com NPD1 (Cayman®, Ann Arbor, MI) na dose de 5µg/rato, diluído em líquido cefalorraquidiano artificial (CSF) (Tocris Bioscience™, Minneapolis, MN), por via intracerebroventricular (ICV), administrado diretamente no ventrículo cerebral lateral direito. O grupo CSF foi tratado apenas com o veículo, recebendo apenas CSF ICV administrado na mesma região.

Todos os tratamentos foram realizados 1 hora após 2 horas de oclusão da artéria cerebral média (MCAo), em um fluxo de administração constante de 3 minutos utilizando uma bomba de infusão (Kd Scientific™, Holliston, MA). A administração dos tratamentos foi realizada de maneira cega. As doses experimentais neuroprotetoras de DHA e NPD1 foram escolhidas com base em estudos previamente publicados (BELAYEV et al., 2009b; YAO et al., 2013).

4.5. Procedimento para administração de NPD1

Trinta minutos após a remoção do fio de sutura, uma cânula de infusão cerebral foi implantada no ventrículo lateral direito para administração de NPD1 ou veículo (CSF) em cada animal. Resumidamente, os ratos foram anestesiados com isoflurano a 3% e fixados a um aparelho estereotáxico (Harvard Apparatus®, South Natick, MA) com crânio nivelado entre bregma e lambda. Uma cânula estéril de aço inoxidável (5 mm de comprimento) (ALZET®, Curpetino, CA) foi implantada no ventrículo lateral utilizando as coordenadas estereotáxicas (0,2 mm caudal a bregma, 2 mm lateral à linha média e 5 mm abaixo da dura-máter) (BHATTACHARJEE et al., 2017). Cânulas foram removidas após o tratamento ser concluído.

4.6. Desenho experimental

Este estudo foi dividido em 3 séries principais de experimentos que seguiram o seguinte desenho experimental:

- **Série (1): Efeito do DHA na Neurogênese 2 semanas após isquemia-reperfusão (IR):** Grupos ($n= 10-12$ por grupo) foram tratados com DHA (5mg/Kg i.v.) ou solução salina (0,9% i.v.) 1 hora após 2h de MCAo. Avaliação neurocomportamental foi realizada no 1º, 2º, 3º e no 14º dia após IR. Administração de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) foi realizada no 4º, 5º e 6º dia após IR. No 14º dia após IR, amostras foram obtidas e processadas para análises histopatológicas e imunohistoquímicas.
- **Série (2): Efeitos neuroprotetores do DHA sobre a síntese de NPD1 na área de penumbra isquêmica na 4ª e 5ª hora após IR; efeito neuroprotetor do DHA a longo prazo no período de 4 semanas após IR:** Grupos ($n= 6-8$ por grupo) foram tratados com DHA (5mg/Kg i.v.) ou solução salina (0,9% i.v.) 1 hora após 2h de MCAo. Análises lipídômicas foram realizadas na 4ª e 5ª hora após 2 horas de MCAo. Análises neurocomportamentais foram realizadas na 4ª e 5ª hora e então no 1º, 2º, 3º dia e na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semana após IR. Análises histopatológicas e imunohistoquímicas foram realizadas na 4ª semana.
- **Série (3): Efeito do NPD1 na penumbra isquêmica 7 dias após IR:** Grupos ($n= 7-10$ por grupo) foram tratados com NPD1 (5µg/por rato ICV) ou CSF (ICV) 1 hora após 2h de MCAo. Análises neurocomportamentais foram realizadas no 1º, 2º, 3º e no 7º dia após IR. Imageamento por ressonância magnética, análises histopatológicas e imunohistoquímicas foram realizadas no 7º dia.

4.7. Ensaio de marcação com 5-Bromo-2'-Deoxiuridina (BrdU) *in vivo*

O BrdU é um nucleotídeo sintético análogo da timina que pode ser incorporado durante a síntese de DNA nas células em multiplicação, durante a fase S do ciclo celular. Neste estudo BrdU foi utilizado como um marcador de células em proliferação. BrdU (50 mg/kg, diluído em solução salina, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) foi administrado i.p. no 4º, 5º e 6º dia após MCAo (ARVIDSSON et al., 2002; THIYAGARAJAN et al., 2008; ZHANG et al., 2006).

Ao final do protocolo, os animais foram profundamente anestesiados com a mesma combinação anestésica descrita anteriormente, e transcardiacamente perfundidos com solução salina a 0,9%, seguido por paraformaldeído a 4%, na 2ª semana após IR. Os cérebros foram removidos, processados histologicamente e depois submetidos a imunohistoquímica para BrdU conforme protocolo do fabricante. Resumidamente, as secções histológicas foram incubadas em HCl 2N para desnaturar o DNA à temperatura ambiente durante 1 hora e depois neutralizadas com ácido bórico 0,1 M (pH 8,5) durante 5 min por duas vezes. Após estes passos adicionais, a imunohistoquímica foi realizada como descrito abaixo.

4.8. Análises histopatológicas

Ao final de cada protocolo experimental, os animais foram profundamente anestesiados com a mesma combinação anestésica descrita anteriormente, e transcardiacamente perfundidos com solução salina a 0,9%, seguido por paraformaldeído (PFA) a 4% na 1ª, 2ª ou 4ª semana. Os cérebros foram então removidos e pós-fixados em 4% de PFA, e depois crioprotetidos em 30% de sacarose e seguidamente embebidos numa matriz gelatinosa utilizando a Tecnologia MultiBrain™ (NeuroScience Associates, Knoxville, TN) como descrito anteriormente (THOMPSON et al., 2006).

Os cérebros foram processados histologicamente e cortados em secções coronais (40 µm de espessura) utilizando-se um aparelho de criostato. As secções coronais foram coradas por cresil violeta segundo método de Nissl. Para quantificar o volume do infarto, as secções histológicas foram digitalizadas (MCID core imaging software; InterFocus Imaging Ltd., Cambridge, England) em nove níveis coronais padronizados (níveis de

bregma +5,2, +2,7, +1,2, -0,3, -1,3, -1,8, -3,8, -5,0 e -7,3 mm) utilizando-se uma câmera CCD (QICAM Fast 1394, QIMAGING, British Columbia, Canadá) (BELAYEV et al., 1996). As secções coronais dos cérebros foram visualizadas e fotografadas num microscópio motorizado BX61VS (Olympus, Japão) com uma objetiva de 10x.

Em seguida, um investigador cego para os grupos experimentais, delineou a zona do infarto cortical e subcortical, bem como os hemisférios esquerdo e direito de cada secção. O volume do enfarte foi calculado como o produto integrado da área de secção transversal e distância inter-seccional e corrigido para o edema cerebral (ZHANG et al., 2015). O edema cerebral foi medido pela diferença entre os hemisférios ipsi- e contralaterais (ZHANG et al., 2015). Volume de tecido residual (normal) no hemisfério direito, perda tecidual e porcentagens [relativo ao volume do hemisfério não lesionado (esquerdo)] foram calculados (BELAYEV et al., 2009a).

4.9. Análises imunohistoquímicas

Secções histológicas adjacentes as utilizadas para as análises histopatológicas foram submetidas a imunohistoquímica na 2ª ou 4ª após MCAo. Resumidamente, as secções foram permeabilizadas em Triton X-100 a 0,5% em PBS (PBST) durante 30 min e depois bloqueadas com 5% de soro de cavalo em 0,1% de PBST durante 1 h. Os anticorpos primários foram incubados em soro de cavalo a 5% em PBST a 0,1% *overnight* a 4 °C. As secções foram então incubadas com os seus respectivos anticorpos secundários em soro de cavalo a 5% em PBST a 0,1% durante 2 horas e depois lavadas com PBST a 0,1% durante 5 min, três vezes entre cada passo.

Foram utilizados os seguintes marcadores: NeuN (Chemicon Inc., Billerica, MA, EUA) para neurônios maduros; anti-BrdU (AbD Serotec, Raleigh, NC, EUA) para células recém proliferadas; Ki-67 (BD PharMingen, San Jose, CA, EUA) como marcador de células mitóticas; Doublecortin (DCX, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) como marcador de neurônios imaturos e pós-mitóticos precoces; Proteína ácida fibrilar glial (GFAP, Dako, Dinamarca) para marcar astrócitos reativos; Iba-1 (Wako, Richmond, VA, EUA) para microglia/micrófagos ativados; SMI-71 (BioLegend, San Diego, CA), como marcador vascular de barreira hematoencefálica de ratos; coloração por Hoechst 33342 (Sigma, Oakville, ON, Canadá) como marcador para a apoptose neuronal; anticorpo

biotinilado anti-imunoglobulina G de ratos (IgG) (BioLegend, San Diego, CA) para detectar a quebra da unidade neurovascular (NVU); e anticorpo anti-proteína fosforilada associada ao crescimento neuronal (pGAP-43) (Merck Millipore, Billerica, MA) para detectar densidade de germinação axonal (**Tabela 2**).

O número de células positivas e vasos imunopositivos foi contado no giro denteado (DG), nas seguintes porções: ápice, lâmina lateral (porção suprapiramidal) e lâmina medial (porção infrapiramidal), zona subventricular (SVZ) (no nível de bregma - 3,8 mm), e no córtex e estriado ao nível da lesão central (nível de bregma - 0,3 mm). Os dados foram expressos como números de células e vasos positivos por campo microscópico de alta potência (40 x). As imagens das seções foram obtidas usando microscópio confocal a laser (LSM510, Carl Zeiss MicroImaging, Irvine, CA). As imagens foram adquiridas com dimensão 212,3 µm × 212,3 µm usando o software Zen (Carl Zeiss MicroImaging).

A análise das imagens foi realizada utilizando o software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD). Células BrdU/Ki-67+, BrdU/DCX+ e BrdU/NeuN+ foram contadas dentro do campo de imagem na região de DG, SVZ e zona de peri-infarto cortical. Células NeuN+ e GFAP+ e a intensidade fluorescência de Iba-1 foram analisadas e medidas na área de penumbra isquêmica (córtex) e *core* (subcórtex).

A intensidade da imunexpressão de IgG foi calculada e medida nos mesmos níveis avaliados para dano isquêmico como descrito anteriormente (HALEY; LAWRENCE, 2016; READNOWER et al., 2010). Para calcular a intensidade da imunexpressão de IgG, as imagens foram convertidas em escala de cinza, e os valores médios de cinza foram registrados e comparados. O software ImageJ atribui aos pixels pretos o valor numérico de “0” e para os pixels brancos o valor numérico de “1”. As graduações de cinza recebem os valores numéricos intermediários, aumentando com a luminosidade do pixel e diminuindo com o seu escurecimento. Os valores de intensidade da imunomarcção para IgG foram expressos de acordo com a reciprocidade da média de cinza para a clareza gráfica. Todas as imagens foram obtidas ao mesmo tempo com as mesmas configurações e sem nenhum ajuste de brilho ou contraste. A intensidade da imunomarcção para IgG foi medida em todos os hemisférios contralateral e ipsilateral, bem como no córtex e no estriado.

Tabela 2. Distribuição dos marcadores celulares utilizados e suas respectivas funções

Marcadores	Função
NeuN	Neurônios Maduros
Anti-BrdU	Proliferação Celular
Ki-67	Células Mitóticas
DCX	Neurônios Jovens
GFAP	Astrócitos Reativos
Iba-1	Micróglia Ativada
SMI-71	Barreira Hematoencefálica
Hoechst 33342	Apoptose Neuronal
Anti-IgG	Ruptura da UNV
Anti-pGAP-43	Densidade Axonal

Fonte: Elaborada pelo autor

4.10. Imageamento por ressonância magnética (MRI) *ex vivo* e detecção dos volumes de lesão do core, penumbra e volume total

Imageamento por ressonância magnética de alta resolução *ex vivo* foi realizado em cérebros fixados em paraformaldeído 4% no 7º dia após MCAo. Foi utilizado o equipamento 11.7 T Bruker Advance horizontal de calibre 8,9 cm com diâmetro de 89mm equipado com uma bobina receptora de 89 mm (ID) (Bruker Biospin, Billerica, MA, EUA) na Universidade de Loma Linda, CA, USA. T2WI de alta resolução, imagens difusão ponderada (DWI), volumes 3D e mapeamento de coeficiente de difusão aparente (ADC) foram obtidos como descrito anteriormente (OBENAU; DILMAC; TONE, 2011).

Os mapas T2 e ADC foram computados a partir de T2WI e DWI, respectivamente. Foi utilizado o sistema de divisão hierárquica por região (HRS) para identificar automaticamente os volumes do *core* e penumbra (lesão total = *core* + penumbra) do relaxamento do T2 e mobilidade da água (ADC), conforme publicado anteriormente (SERHAN et al., 2015). A determinação do tecido de penumbra por HRS (implementada no MATLAB) foi validada anteriormente através da utilização de subtrações por imagiologia de perfusão ponderada (PWI)/DWI de cada nível cerebral (SERHAN et al.,

2015). A área de penumbra identificada por HRS foi definida utilizando-se os valores de T2 e ADC, entre o tecido cerebral normal e o *core* isquêmico. Os dados de cada modalidade foram resumidos por grupo.

4.11. Análise lipidômica

4.11.1 Preparo das amostras

Os animais foram submetidos a eutanásia 4^a e 5^ah após MCAo para investigar o efeito do DHA na síntese de NPD1 na penumbra isquêmica. Os cérebros foram removidos, divididos em hemisférios direito e esquerdo, e a área de penumbra (córtex) foi dissecada ao nível de bregma - 0,3 mm. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após obtenção e posteriormente submetidas a análise lipidômica conforme descrito anteriormente. NPD1, ácido 17-hidroxidocosahexaenóico (17-HDHA; um derivado estável de 17H(p)DHA, o precursor NPD1) e ácido 14-hidroxidocosahexaenóico (14-HDHA; um precursor da marsina 1) foram caracterizados na área de penumbra por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem com ionização por electrospray (LC-PDA-ESI-MS/MS) utilizando o espectrômetro de massa em tandem de estágio triplo TSA Quantum Ultra UPLC-MS/MS da Thermo Electronic Company, Inc., no modo SEM (BAZAN et al., 2012).

4.11.2. Extração lipídica

As amostras foram homogeneizadas em metanol (MeOH) gelado com o auxílio de um homogeneizador de vidro sobre gelo de tal forma que o volume total do homogenato foi de 3 mL. 5 μ da mistura padrão (5 ng de LTB4-d4, 15-HETE-d8, PGD2-d4, EPA-d5 e 25 ng de AA-d8, todos adquiridos da Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) foram sonicados em banho maria com gelo por 30 min. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C *overnight* para a extração. No dia seguinte, a coluna C18 (BondElut 500 mg, Agilent Technologies) foi equilibrada com 20 ml de MeOH gelado seguido por 20 ml de H₂O gelada num coletor a vácuo para extração de fase sólida. A amostra foi diluída com H₂O gelada (pH 3.5), de forma que a concentração de MeOH foi 10~15% e o pH da amostra

tornou-se 3.5 ~ 4.0 antes de ser carregada na coluna. A amostra foi carregada na coluna com 1 a 2 gotas por minuto. A coluna foi lavada com H₂O e 2 ml de hexano seguida da adição 10 ml de metil formato. A amostra foi seca sob fluxo de N₂ e ressuspensa com 10µl de MeOH seguido por 5 µl de H₂O.

4.11.3. Cromatografia líquida / Espectrometria de massa

Xevo TQ-S equipado com Acquity I Class UPLC (Waters®) foi utilizado para análise lipidômica. A coluna UPLC HSS T3 1,8 µm 2,1 × 50 mm foi utilizada para ácidos graxos e seus derivados. Setenta e cinco por cento do solvente A (H₂O + 0,1% de ácido acético) e 25% do solvente B (90% acetonitrilo, 10% isopropanol) com fluxo de 0,6 ml/min foram usados durante o primeiro minuto, depois gradiente de 100% de solvente B aos 8,5 min seguiu 100% de B até aos 11 min. Em seguida, a coluna foi reequilibrada para 75% A e 25% B durante 2 min. A tensão capilar foi - 2,5 kV, temperatura de dessolvatação a 600°C, fluxo de gás de dessolvatação a 1100 L/h, gás cone a 150 L/h e pressão do nebulizador a 7.0 bar com a temperatura da fonte a 150 °C. O software MassLynx 4.1 foi usado para operação e registro dos dados.

4.12. Análise estatística

Os valores foram apresentados como média ± E.P.M. Análise de variância (Two-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni ou Teste t de Student foram utilizados para comparações entre os grupos experimentais. Diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05. Análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Graph Pad Prisma 5 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA).

5. RESULTADOS

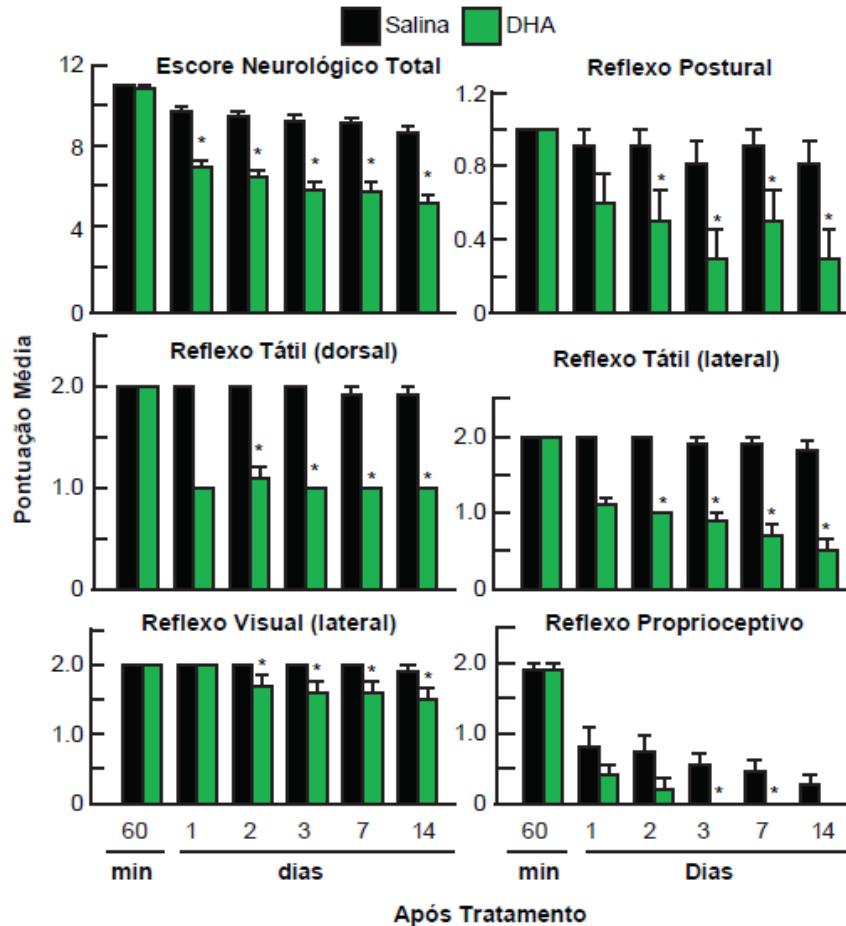
5.1. Análise das variáveis fisiológicas

A análise das temperaturas retal e cranial (músculo temporal), gasometria arterial, glicemia plasmática, pressão arterial e frequência cardíaca não mostraram diferenças significativas entre os grupos experimentais. Assim como não houveram efeitos colaterais comportamentais adversos observados após administração de DHA ou NPD1 nos animais de todos os grupos.

5.2. DHA promoveu a recuperação neurocomportamental 2 semanas após MCAo

Os animais tratados com DHA (5mg/Kg i.v.) apresentaram melhora significativa ($*p<0,05$) das funções neurológicas avaliadas por testes neurocomportamentais em até 2 semanas após isquemia-reperfusão em comparação ao grupo controle. Uma única dose de DHA administrado 1 hora após 2 horas de MCAo melhorou significativamente o escore neurológico total resultando em melhora substancial do reflexo postural, reflexo tátil (lateral e dorsal), reflexo visual (lateral) e resposta proprioceptiva contralateral em comparação com o grupo tratado unicamente com salina (**Figura 13**).

Figura 13. Efeito do DHA sobre a evolução neurológica de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) durante o período de 2 semanas após isquemia-reperfusão (IR)



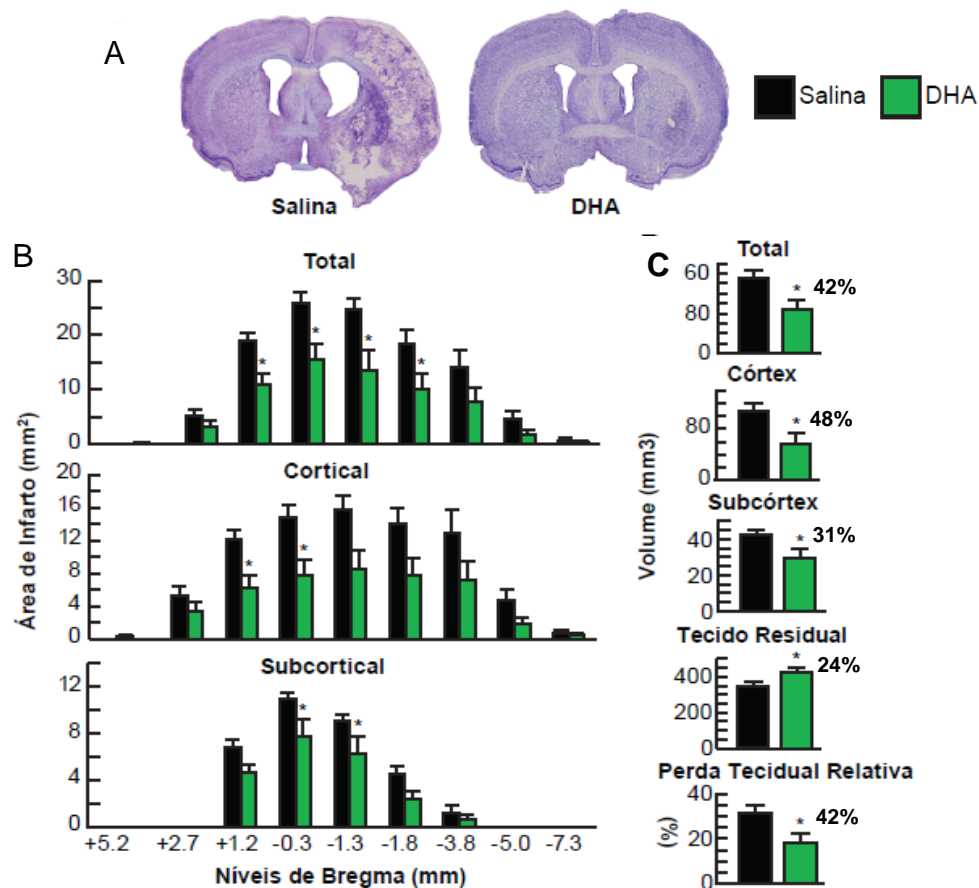
Evolução neurológica do reflexo postural, reflexo tátil (lateral e dorsal), reflexo visual (lateral) e resposta proprioceptiva de ratos submetidos a 2h de MCAo e tratados com DHA (5mg/kg i.v.) 1h após 2h de MCAo no período 2 semanas após isquemia-reperfusão. (Normal = 0, Déficit neurológico máximo = 12). Valores expressos em média \pm E.P.M. (n=10-11 animais/ por grupo). *p<0,05 vs. grupo salina (Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni comparação de dois grupos).

5.3. DHA melhorou os achados histopatológicos reduzindo a área e volume de infarto cortical, subcortical e total 2 semanas após MCAo

Quando submetidos à análise histopatológica, os animais controle tratados com salina exibiram grandes áreas de infarto, apresentando lesões pan-necróticas envolvendo as regiões corticais e subcorticais do hemisfério direito caracterizadas microscopicamente pela destruição de elementos neuronais, gliais e vasculares (**Figura 14-A**).

Em contraste, os animais tratados com DHA (5mg/Kg i.v.) exibiram áreas de infarto drasticamente menores, sendo este localizado principalmente na área subcortical. O Tratamento com DHA reduziu significativamente ($*p<0,05$) as áreas de infarto em múltiplos níveis de bregma (**Figura 14-B**) assim como o volume de infarto total em 42%, cortical 48% e subcortical 31% quando comparado com o grupo controle. Além disso, os animais que receberam DHA como tratamento, apresentaram uma maior porcentagem do volume tecidual normal preservado de 24% e uma menor perda tecidual relativa de até 42% em comparação com os animais do grupo controle (**Figura 14-C**).

Figura 14. Efeito do DHA sobre as alterações histopatológicas em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 2 semanas após isquemia-reperfusão



(A) Secções coronais coradas por Nissl (nível de bregma - 0.3 mm) de ratos tratados com DHA ou solução salina. (B) Área (mm²) de infarto total, cortical e subcortical, quantificada em nove níveis coronais de bregma. (C) Quantificação do volume (mm³) de infarto cortical, subcortical, total, tecido residual e perda tecidual relativa. Valores expressos em média \pm E.P.M. (n=10-11 animais/ por grupo). $*p<0,05$ vs. grupo salina (Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni; Teste t de Student - T-test).

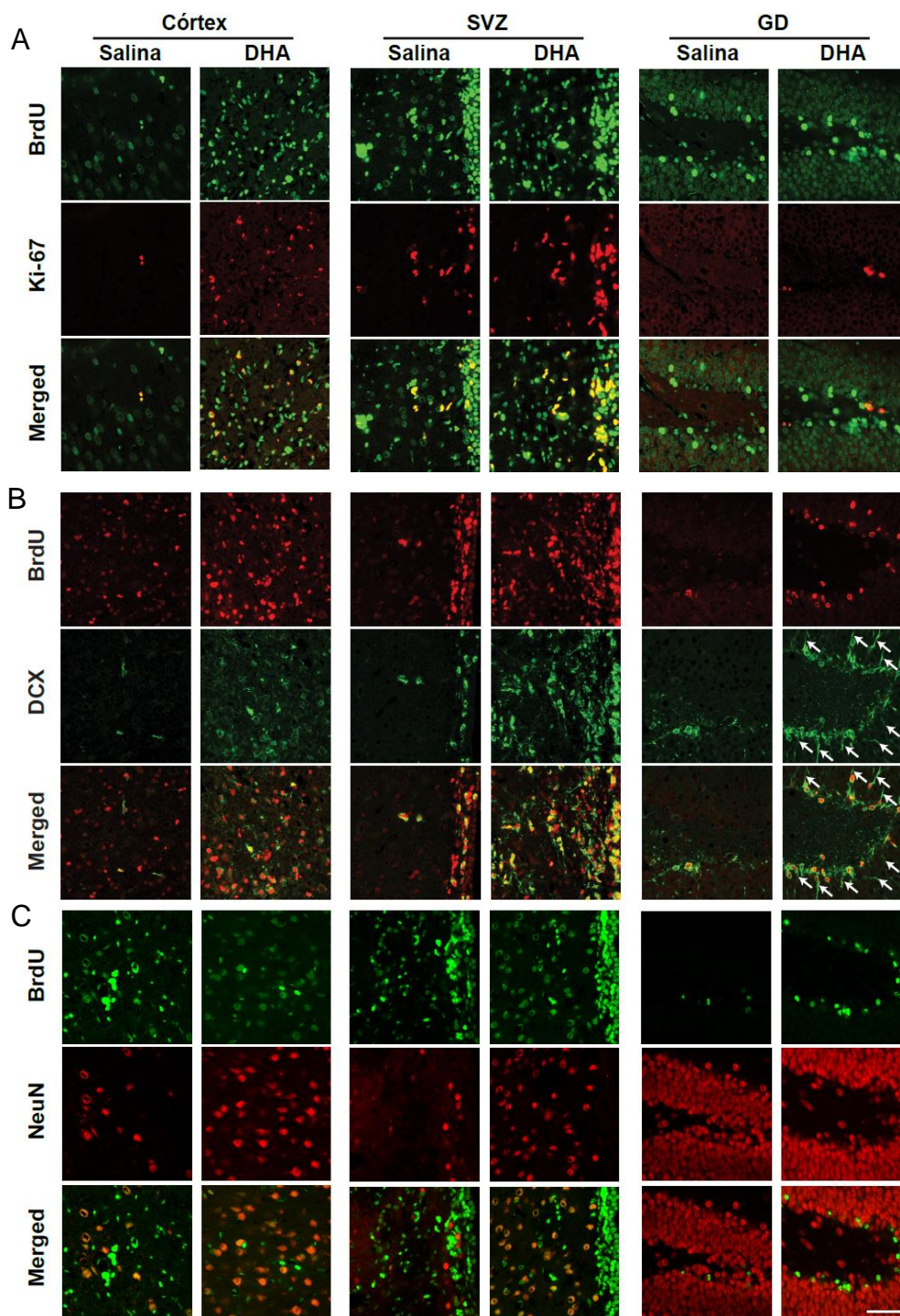
5.4. DHA promoveu sobrevivência celular e favoreceu a neurogênese 2 semanas após MCAo

Os animais tratados com DHA (5mg/Kg i.v.) exibiram aumento significativo ($*p<0,05$) de células BrdU⁺/ki-67⁺ na região de borda do infarto, parede ventricular da zona SVZ e na camada de células granulares (CCG) do giro denteado (GD) 2 semanas após MCAo (**Figura 15-A**). O número de células BrdU⁺/ki-67⁺ nos animais do grupo tratado com DHA foi aumentado significativamente ($*p<0,05$) em 88% no córtex, 40% em SVZ e GD (270% GD1 e 138% GD total) em comparação com o grupo controle salina (**Figura 16-B**).

O tratamento com DHA aumentou significativamente ($*p<0,05$) as células duplamente marcadas com BrdU/DCX no córtex, na parede ventricular na zona SVZ e na CCG do GD quando comparado com o grupo controle (**Figura 15-B**). Foi observado ainda, que no grupo tratado as células BrdU⁺/DCX⁺ exibiram dendritos mais robustos e alongados direcionados para a camada molecular do GD quando comparado com o grupo controle (Figura 15-B). O número de células BrdU⁺/DCX⁺ no grupo DHA aumentou em 65% no córtex, o 29% em SVZ e em GD (58% GD1, 34% GD2, 65% GD3 e 53%GD total) quando comparações foram feitas com o grupo controle (**Figura 16-B**).

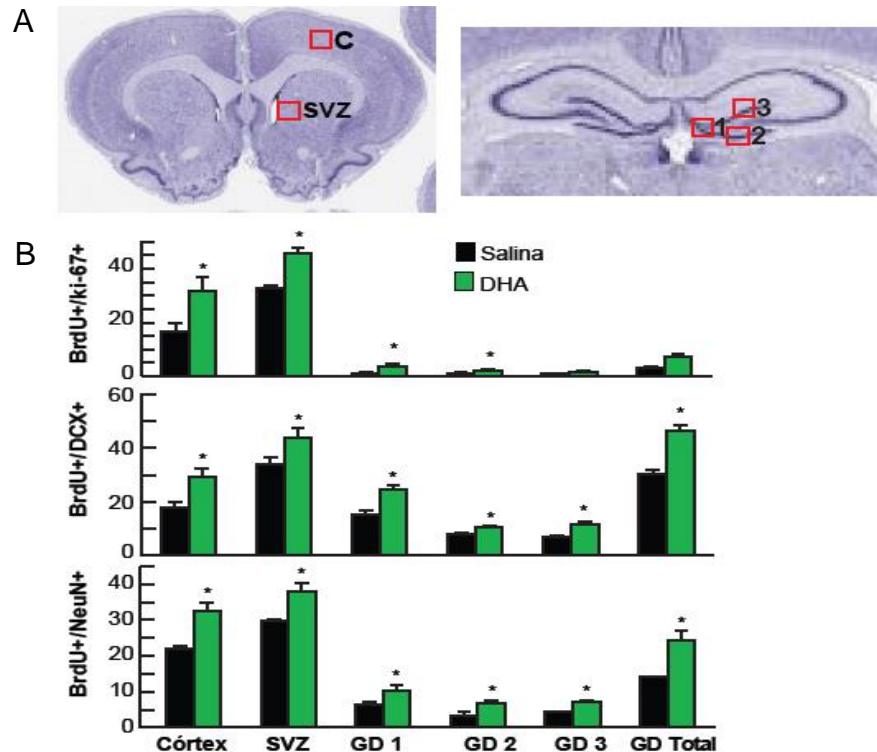
Foi observado que a administração de DHA promoveu o aumento significativo ($*p<0,05$) do número de células duplamente marcadas BrdU⁺/NeuN⁺ no córtex, região SVZ e no GD em comparação ao grupo controle 2 semanas após MCAo (**Figura 15-C**). O tratamento com DHA aumentou as células BrdU⁺/NeuN⁺ em 49% no córtex, 28% na zona SVZ e 42% GD total em comparação com o grupo controle (**Figura 16-B**).

Figura 15. Efeito do DHA sobre a neurogênese em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 2 semanas após isquemia-reperfusão



Imagens de imunofluorescência representativas da dupla marcação por (A) BrdU/ki-67⁺ (BrdU-verde; ki-67-vermelho), (B) BrdU/DCX⁺ (BrdU-vermelho; DCX-verde) setas indicam dendritos das células BrdU/DCX⁺ e (C) BrdU/NeuN⁺ (BrdU-verde; NeuN-vermelho) na região de peri-infarto no córtex, SVZ e GD 2 semanas após MCAo. Barra de escala 50-µm. SVZ-zona subventricular, GD-giro dentado.

Figura 16. Efeito do DHA sobre o número de células BrdU⁺, DCX⁺ e NeuN⁺ nas regiões do córtex, zona subventricular (SVZ) e giro denteado (GD) de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 2 semanas após isquemia-reperfusão

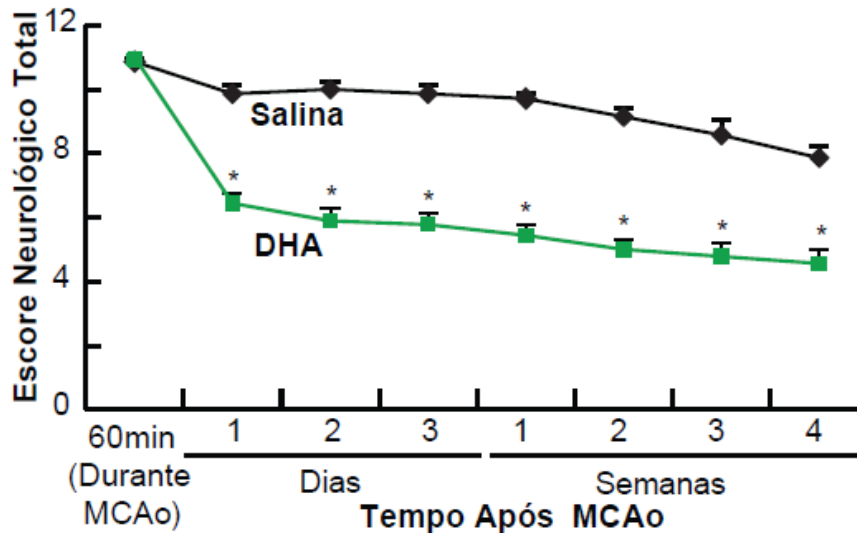


(A) Diagramas cerebrais representativos da localização das regiões de contagem de células positivas na área da borda de infarto cortical (C), SVZ em nível de bregma +1,2 mm e três regiões do giro denteado (DG) em nível de bregma -3,8 mm (1-GD ápice, 2-GD porção infra-piramidal, 3-GD porção supra-piramidal). (B) Quantificação de células duplamente marcadas para BrdU/ki-67⁺, BrdU/DCX⁺ e BrdU/NeuN⁺ na região de peri-infarto no córtex, SVZ e DG. Valores expressos em média ± E.P.M. (n=10-11 animais/ grupo). *p<0,05 vs. grupo salina (ANOVA seguido do teste de Bonferroni; comparação de dois grupos; Teste t de Student, T-test).

5.5. Tratamento com DHA promoveu a recuperação neurocomportamental 4 semanas após MCAo

Os animais tratados com DHA (5mg/Kg i.v.) apresentaram melhora significativa (*p<0,05) das funções neurológicas avaliadas por testes neurocomportamentais em até 4 semanas após MCAo em comparação ao grupo controle. A administração de DHA 1 hora após 2 horas de MCAo melhorou significativamente o escore neurológico total dos animais pertencentes ao grupo tratado contralateral em comparação ao grupo tratado salina, ainda que este tenha apresentado uma melhora discreta ao fim do período experimental (**Figura 17**).

Figura 17. Efeito do DHA sobre a evolução neurológica total de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) durante o período de 4 semanas após isquemia-reperfusão

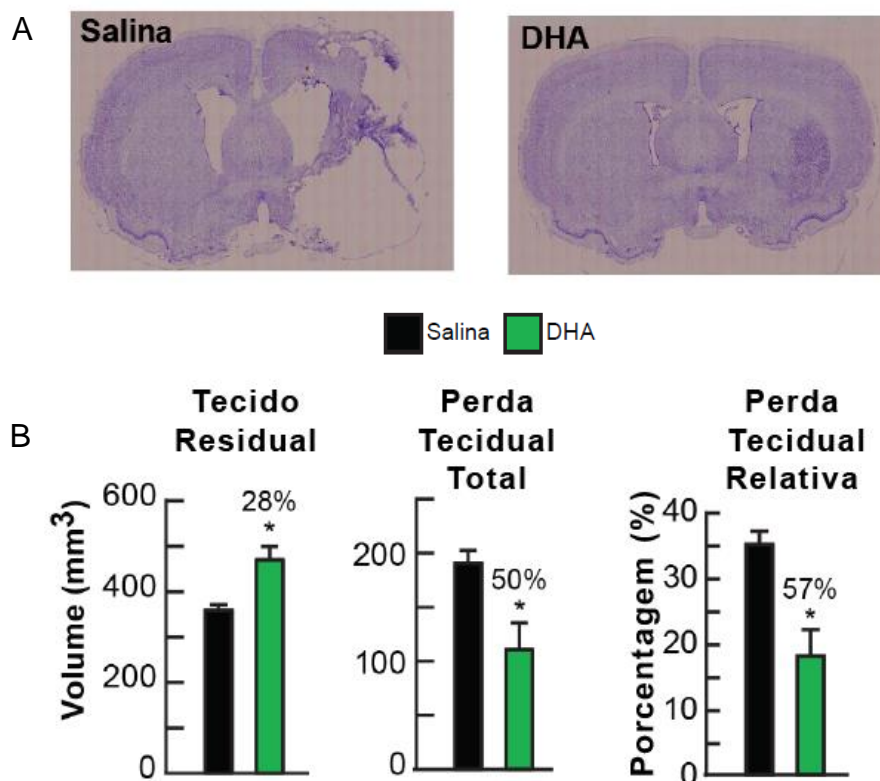


Evolução neurológica do escore neurológico total de ratos submetidos a 2h de MCAo e tratados com DHA (5mg/kg i.v.) ou solução salina 1h após 2h de MCAo no período 4 semanas após isquemia-reperfusão. (Normal = 0, Déficit Neurológico máximo = 12). Valores expressos em média \pm E.P.M. (n=8-9 animais/ por grupo). * $p < 0,05$ vs. grupo salina (ANOVA seguido do teste de Bonferroni; comparação de dois grupos; Teste t de Student, T-test).

5.6. DHA melhorou os achados histopatológicos preservando o volume tecidual residual e reduzindo a perda tecidual total e relativa 4 semanas após MCAo

A análise histopatológica dos animais pertencentes ao grupo controle tratados com salina mostrou grandes áreas de infarto associadas com desenvolvimento de cavidades na área cortical e subcortical (**Figura 18-A**). Por outro lado, os animais do grupo tratado com DHA apresentaram uma redução significativa (* $p < 0,05$) do tamanho da área de infarto em comparação ao grupo controle. No grupo tratado, a área de infarto ficou localizada principalmente na área subcortical. DHA preservou o volume tecidual residual em 28%, reduziu a perda tecidual total em 50% e a perda relativa em 57% em comparação ao grupo controle (**Figura 18-B**).

Figura 18. Efeito do DHA sobre as alterações histopatológicas em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 4 semanas após isquemia-reperfusão



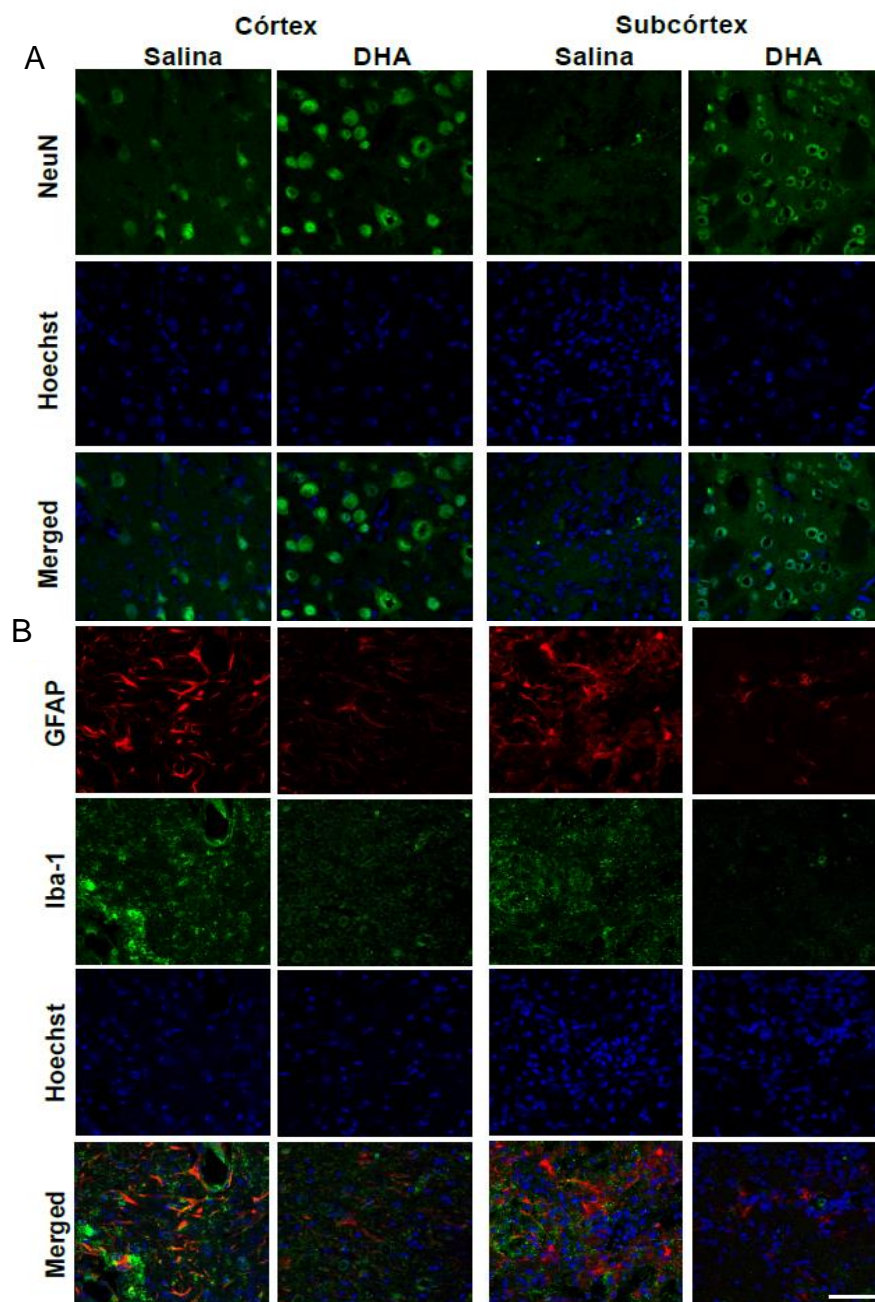
(A) Secções coronais coradas por Nissl (nível de bregma – 0.3 mm) de ratos tratados com DHA ou solução salina. (B) Quantificação do volume (mm³) de tecido residual preservado, perda tecidual total e relativa em comparação ao hemisfério contralateral normal esquerdo. Valores expressos em média \pm E.P.M. (n=8-9 animais/ por grupo). *p<0,05 vs. grupo salina (ANOVA seguido do teste de Bonferroni; comparação de dois grupos, Teste t de Student – T-test).

5.7. DHA atenuou o dano celular preservando o número de neurônios na região de infarto, reduzindo apoptose, infiltração microglial e o número de astrócitos reativos 4 semanas após MCAo

Animais pertencentes ao grupo controle mostraram uma consistente perda neuronal caracterizada pelo aumento do número de células apoptóticas marcadas pelo corante fluorescente Hoechst 33342. O grupo salina exibiu ainda, um aumento significativo do número de astrócitos reativos GFAP⁺ na região da borda do infarto cortical e subcortical. Ao redor das células GFAP⁺ foi observado uma infiltração maciça de micróglia/macrófagos ativados Iba-1⁺ (**Figura 19**).

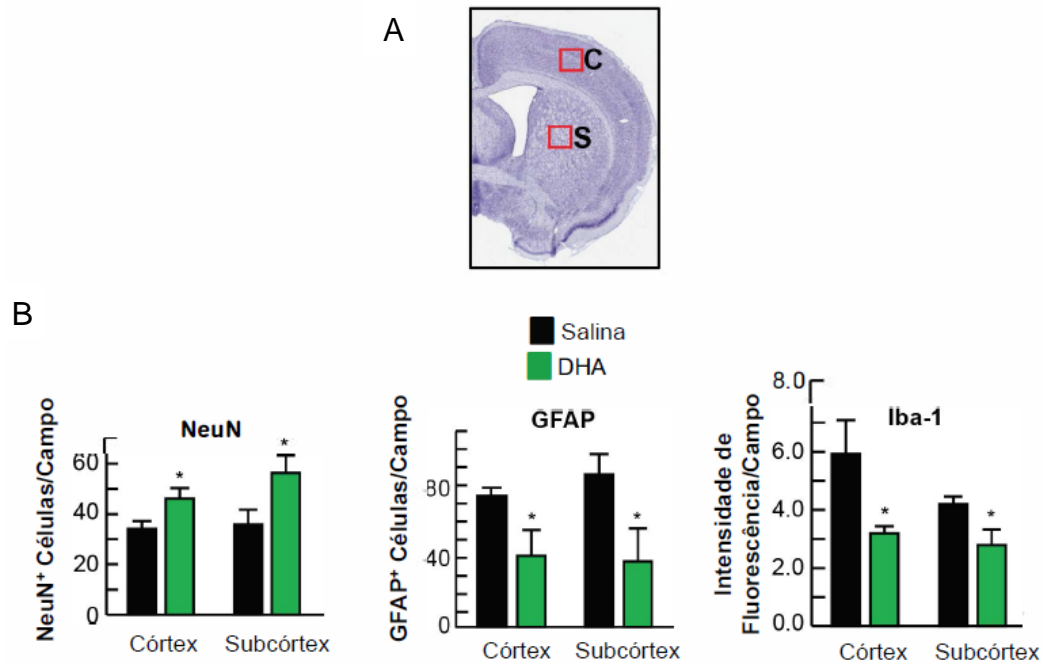
Em contraste, DHA foi capaz de reduzir significativamente (* $p < 0,05$) o dano neuronal, a infiltração microglial de células Iba-1⁺ assim como o número de astrócitos reativos GFAP⁺ na região de infarto cortical e subcortical em comparação com o grupo controle. O tratamento com DHA diminuiu a ativação microglial evidenciada pela redução da emissão de fluorescência de Iba-1 em 46,2% no córtex e em 33,5% no subcórtex em comparação com o grupo controle. DHA reduziu o número de astrócitos GFAP⁺ em 45,7% e 56,9% na borda do infarto cortical e subcortical respectivamente em comparação com os animais não tratados. Foi observado ainda, que o grupo tratado com DHA apresentou um número de células NeuN⁺ significativamente maior nas regiões de infarto observadas em relação ao grupo controle (**Figura 20-B**).

Figura 19. Efeito do DHA sobre o dano celular isquêmico: Apoptose neuronal, infiltração microglial e astrócitos reativos nas regiões corticais e subcorticais em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 4 semanas após isquemia-reperfusão



Imagens de fluorescência representativas da imunomarcagem para (A-B) NeuN⁺ (verde), GFAP⁺ (vermelho), Iba-1⁺ (verde) e coloração por Hoechst nas regiões de peri-infarto corticais e subcorticais 4 semanas após MCAo. Barra de escala 50- μ m.

Figura 20. Efeito do DHA sobre o número de células NeuN⁺, GFAP⁺ e intensidade de fluorescência da imunomarcação por Iba-1 nas regiões de peri-infarto do córtex e subcórtex de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 4 semanas após isquemia-reperfusão



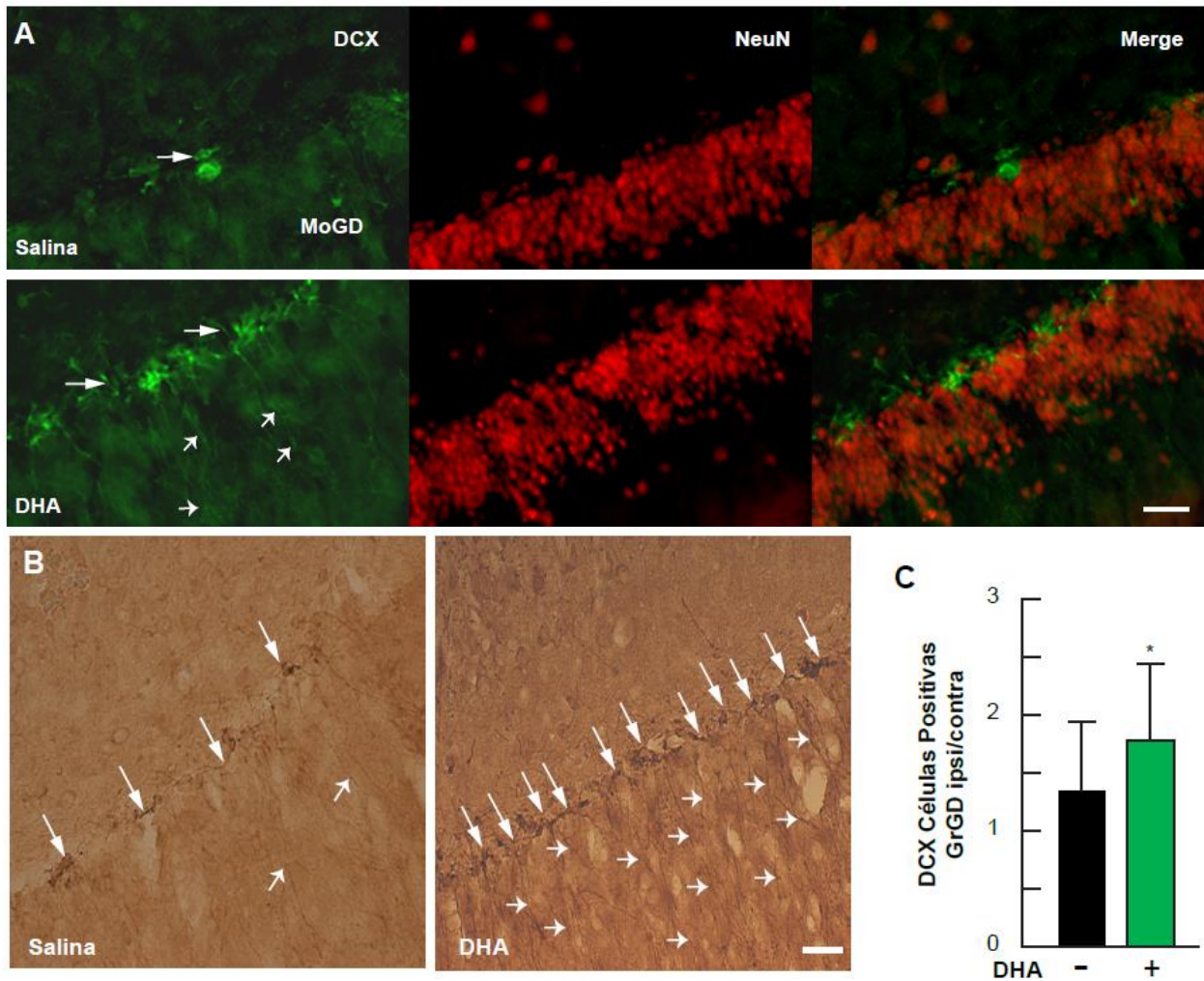
(A) Diagrama cerebral coronal mostrando a localização das regiões de contagem de células positivas. (B) Quantificação de NeuN⁺, GFAP⁺ e Iba-1⁺ no nas áreas de peri-infarto no córtex e subcórtex. Valores expressos em média ± E.P.M. (n=8-9 animais/grupo). *p<0.05 vs. grupo salina (ANOVA seguido do teste de Bonferroni; comparação de dois grupos, Teste t de Student – T-test).

5.8. DHA favoreceu a neurogênese aumentando o número de células DCX positivas no GD e promovendo crescimento dendrítico 4 semanas após MCAo

Os animais tratados com DHA, apresentaram um número significativamente (*p<0,05) maior de células DCX⁺ no GD em comparação com o grupo controle. As células DCX⁺ do giro denteado dos animais tratados apresentaram processos dendríticos extensos que se estendiam por todas as camadas celulares do GD. Foi observado que esses neurônios DCX⁺ apresentaram crescimento dendrítico significativo (*p<0,005) quando comparações foram feitas com o grupo controle (**Figura 21 A-B**).

A quantificação dos neurônios DCX⁺ na camada granular do GD mostrou que animais tratados com DHA apresentaram uma maior razão (*p<0,05) hemisférica ipsi/contralateral de células DCX⁺ em comparação com o grupo controle (**Figura 21-C**).

Figura 21. Efeito do DHA sobre a neurogênese no giro denteado de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 4 semanas após isquemia-reperfusão



(A) Imagens de microscopia de deconvolução duplamente marcadas com DCX⁺ (verde) e NeuN⁺ (vermelho) da camada molecular de ratos tratados com solução salina ou DHA (5mg/Kg) i.v. 4 semanas após a MCAo. (B) Imagens de campo claro de células DCX⁺. (C) Relação das células DCX⁺ no lado ipsilateral em comparação com o lado contralateral. As células DCX⁺ estão localizadas na camada granular do giro denteado (GD). Setas indicam células DCX⁺ e cabeças de seta indicam projeções dendríticas no GD (nível de bregma - 2.16 mm). Dados expressos em médias \pm E.P.M. (n=5 animais/ grupo). *p<0,05 vs. grupo salina (Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, comparação de dois grupos, Teste t de Student - T-test)

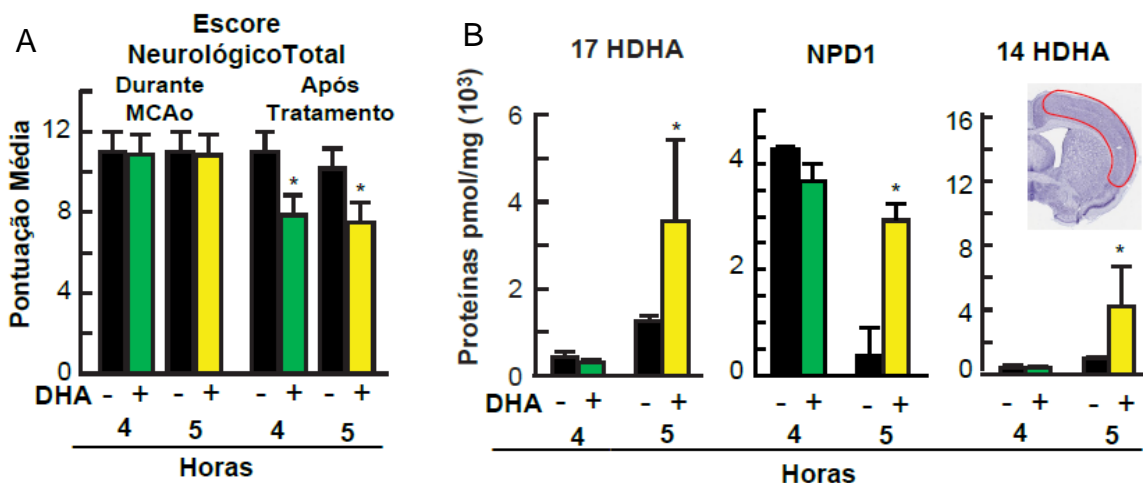
5.9. DHA melhorou a recuperação neurocomportamental e promoveu a síntese de NPD1 na área de penumbra isquêmica na 5ª hora após MCAo

Os animais tratados com DHA apresentaram melhora significativa ($*p<0,05$) das funções neurológicas avaliadas por testes neurocomportamentais na 4ª e 5ª hora após MCAo em comparação ao grupo controle (**Figura 22-A**).

A análise lipidômica realizada por cromatografia líquida associada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) da região cortical ipsilateral dos grupos experimentais demonstrou que a síntese de NPD1 foi potencializada de forma significativa ($*p<0,05$) após o tratamento com DHA na área de penumbra isquêmica na 5ª hora após MCAo em comparação com o grupo controle (**Figura 22-B**).

DHA promoveu ainda o aumento significativo ($*p<0,05$) da síntese dos mediadores lipídicos 17-DHA, um de seus metabólitos de vida curta e precursor de NPD1, e de 14-DHA, precursor da pró-resolvina anti-inflamatória maresina 1, na área de penumbra isquêmica quando comparado ao controle (**Figura 22-B**).

Figura 22. Efeito do DHA sobre a evolução neurológica e síntese de NPD1 na área de penumbra isquêmica de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) na 4ª e 5ª hora após isquemia-reperfusão



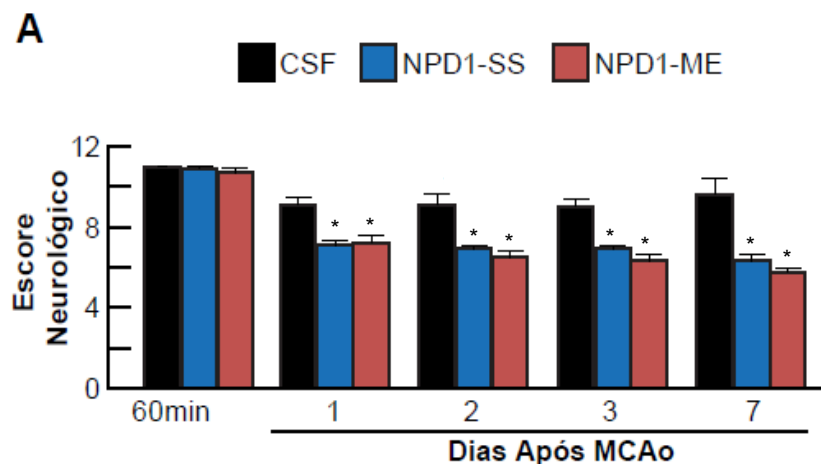
(A) Evolução neurológica do escore neurológico total de ratos submetidos a 2h de MCAo e tratados com DHA (5mg/kg i.v.) ou solução salina 1h após 2h de MCAo na 4ª e 5ª hora após isquemia-reperfusão. (B) Análise quantitativa de extratos lipídicos da penumbra isquêmica na 4ª e 5ª após MCAo e diagrama cerebral coronal mostrando a localização da região utilizada. Dados expressos em médias \pm E.P.M. (n=6 animais/grupo). $*p<0,05$ vs. grupo salina (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, comparação de dois grupos, Teste t de Student – T-test).

5.10. Neuroprotectina D1 (NPD1) promoveu a recuperação funcional motora, protegendo a área penumbra por meio da redução dos volumes das lesões de infarto evidenciados por imageamento por ressonância magnética (MRI) 7 dias após MCAo

Os animais tratados com NPD1 (5µg/rato ICV) em suas duas formas, sal de sódio (NPD1-SS) e metil éster (NPD1-ME), apresentaram melhora significativa (*p<0,05) das funções neurológicas avaliadas por testes neurocomportamentais ao decorrer do período de avaliação de 7 dias após MCAo em comparação com o grupo controle (CSF) (Figura 23).

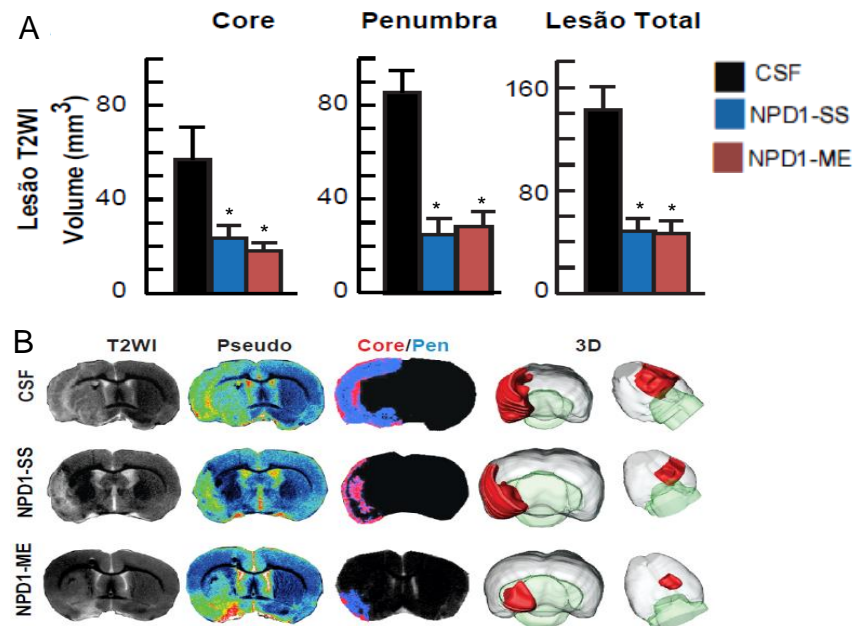
A análise por ressonância magnética dos cérebros dos animais mostrou que os volumes das lesões de infarto do *core* isquêmico, penumbra e da lesão total (calculados a partir do T2WI) foram drasticamente (*p<0,05) reduzidos por ambos tratamentos com NPD1 em comparação com o grupo controle (**Figura 24 A-B**). A avaliação das imagens ponderadas de T2 (T2WI) evidenciou grandes lesões de infarto, e hiperintensidades T2 observadas no *core* isquêmico e na penumbra dos animais do grupo controle, consistente com a formação de edema (**Figura 24-B**).

Figura 23. Efeito do NPD1 sobre a evolução neurológica total de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) durante o período de 7 dias após isquemia-reperfusão



Evolução neurológica do escore neurológico total de ratos submetidos a 2h de MCAo e tratados com NPD1-SS (sal de sódio) ou NPD1-ME (metil éster) (5µg/rato ICV) ou CSF 1h após 2h de MCAo 1, 2, 3 e 7 dias após isquemia-reperfusão. Dados expressos em médias ± E.P.M. (n=6 animais/ grupo). *p<0,05 vs. grupo CSF (Two way ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Figura 24. Imageamento por ressonância magnética *ex vivo* do cérebro de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperfusão



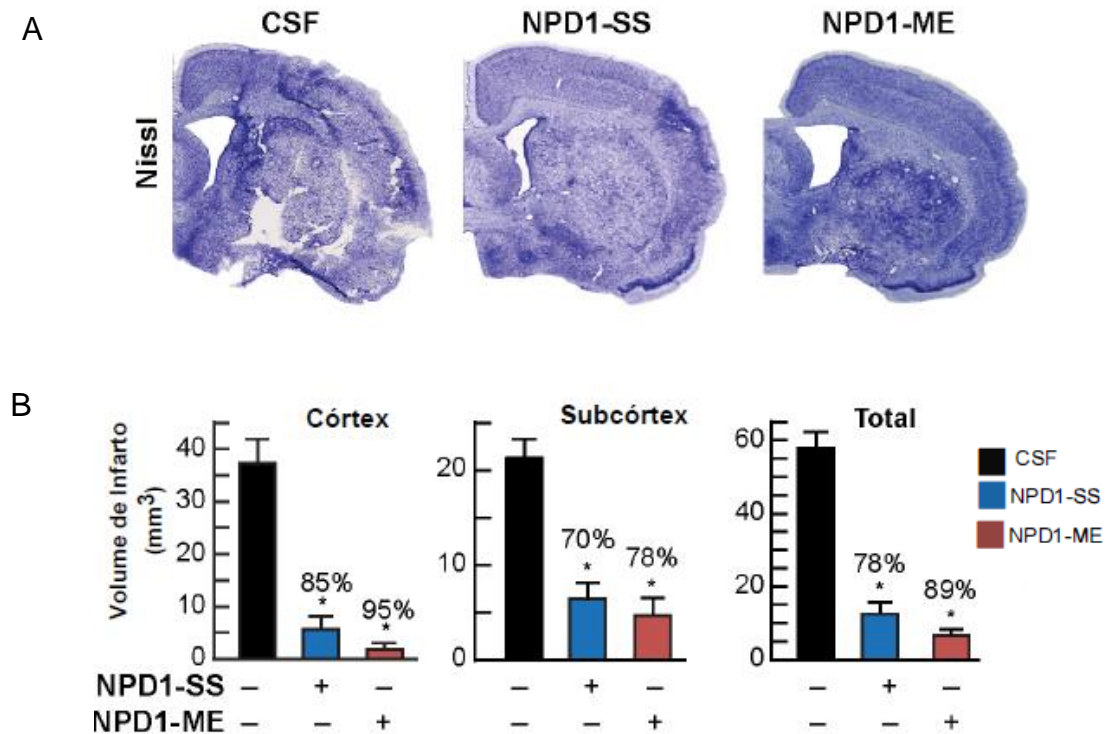
(A) Volumes da lesão isquêmica na área do *core*, penumbra e total das lesões a partir de imagens T2WI no 7º dia após MCAo. (B) Volumes representativos de T2WI, pseudo-imagens, núcleo/penumbra e volumes de lesão 3D calculados a partir de T2WI no 7º após MCAo. Dados expressos em médias \pm E.P.M. (n=6 animais/ grupo). * $p < 0,05$ vs. grupo CSF (ANOVA seguido do teste de Bonferroni, comparação de dois grupos, Teste t de Student – T-test).

5.11. Neuroprotectina D1 (NPD1) reduziu os volumes de infarto cortical, subcortical e total em análise histopatológica 7 dias após MCAo

A análise histopatológica dos animais pertencentes ao grupo controle tratados com CSF mostrou grandes lesões de infarto panocróticas envolvendo as regiões corticais e subcorticais do hemisfério direito (**Figura 25-A**).

Em contraste, os animais tratados com NPD1 exibiram lesões de infarto significativamente (* $p < 0,05$) menores em comparação com o grupo controle CSF, apresentando dano celular menos extenso mais restrito a região subcortical. A neuroproteção mediada por NPD1 foi extensa no córtex frontal-parietal e no subcórtex. Ambos os tratamentos com NPD1 reduziram significativamente (* $p < 0,05$) o volume de infarto, corrigido para o edema cerebral, na região do córtex em 85% e 95%, subcórtex em 70% e 78%, assim como o volume total em 78% e 89% em comparação com o grupo controle (**Figura 25-B**).

Figura 25. Efeito do NPD1 sobre as alterações histopatológicas em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperfusão



Análise histopatológica dos cérebros de ratos submetidos a 2h de MCAo e tratados com NPD1-SS, NPD1-ME (5µg/rato ICV) ou CSF 1h após 2h de MCAo 7 dias após isquemia-reperfusão. (A) Secções coronais representativas coradas por Nissl (nível de bregma – 0.3 mm) de ratos tratados com NPD1-SS, NPD1-ME ou CSF. (B) Quantificação do volume (mm³) de infarto cortical, subcortical e total. Valores expressos em média ± E.P.M. (n=6 animais/ por grupo). *p<0,05 vs. grupo CSF (ANOVA seguido do teste de Bonferroni; comparação de dois grupos, Teste t de Student – T-test).

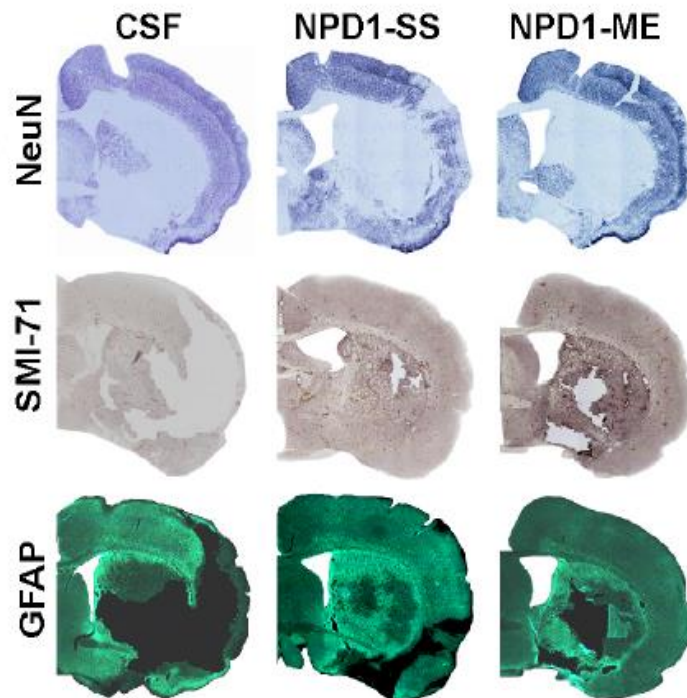
5.12. Neuroprotectina D1 (NPD1) atenuou o dano celular, favoreceu a angiogênese e reduziu a ruptura da unidade neurovascular (UVN) 7 dias após MCAo

A nível histopatológico, os animais do grupo controle CSF exibiram grandes lesões de infarto, caracterizadas pela perda de elementos neuronais, gliais e vasculares conforme evidenciado pela significativa redução na imunomarcagem pelos marcadores NeuN, GFAP e SMI-71 (**Figura 26**). Em contraste, os animais tratados com NPD1 mostraram menores lesões de infarto e um número significativamente (*p<0,05) maior de neurônios NeuN⁺, astrócitos GFAP⁺ e células endoteliais vasculares SMI-71⁺ da barreira hematoencefálica no hemisfério ipsilateral em comparação com o grupo controle (**Figura 27**).

Os tratamentos com NPD1, protegeram a integridade dos vasos sanguíneos por meio do aumento da densidade vascular evidenciado pelo aumento significativo ($*p<0,05$) de células SMI-71⁺ na região de penumbra isquêmica associado com formação paralela de tecido cicatricial mais denso rico em astrócitos GFAP⁺ em comparação com o grupo controle (**Figura 27**).

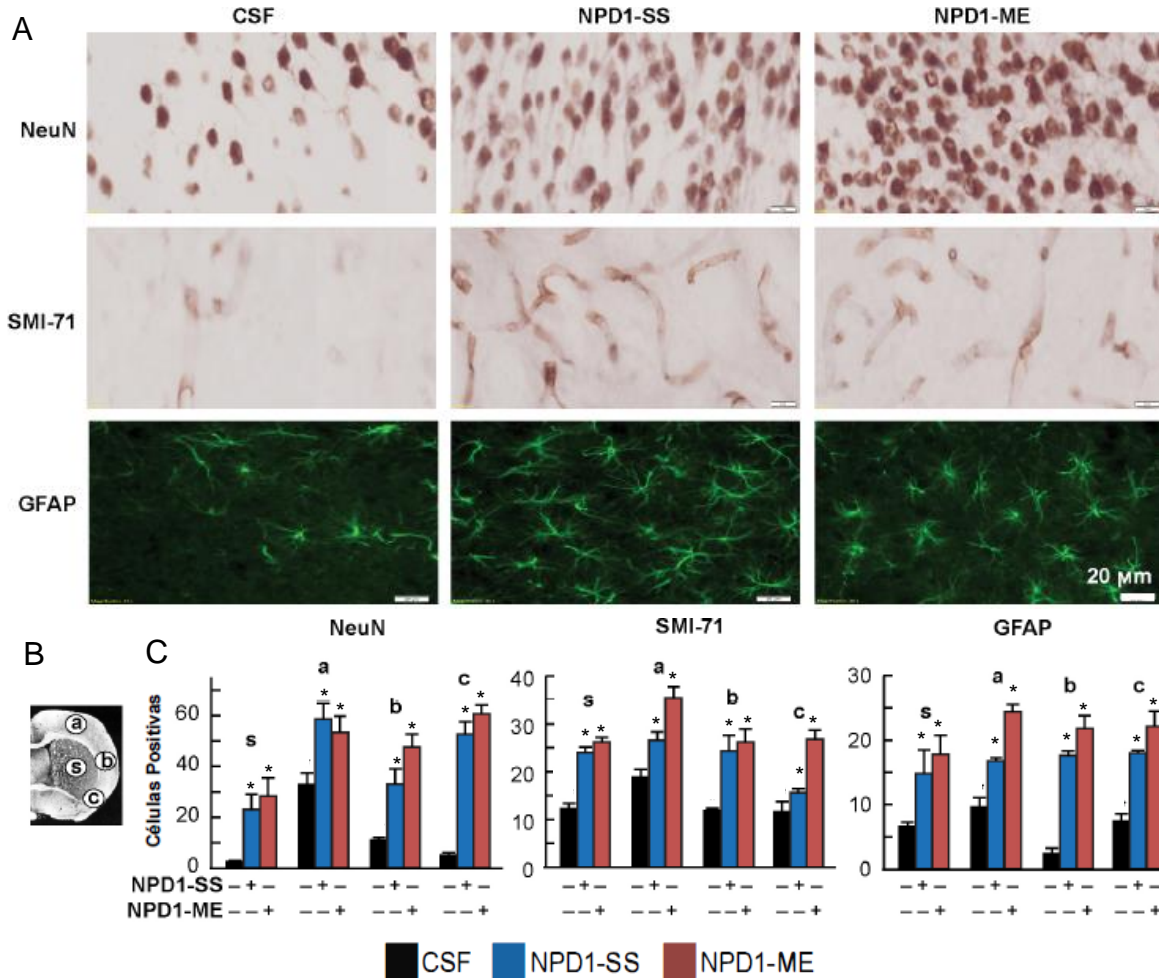
A ruptura isquêmica da unidade neurovascular (UNV) foi avaliada pela infiltração de imunoglobulina G endógena (IgG) no parênquima cerebral. A intensidade da imunoexpressão de IgG foi detectada por método imunohistoquímico e medida no hemisfério ipsilateral 7 dias após MCAo. Foi observado que ambos tratamentos com NPD1 reduziram significativamente ($*p<0,05$) a imunoexpressão de IgG no parênquima cerebral das regiões córtex, subcórtex e em todo o hemisfério direito (total) dos animais tratados em relação aos do grupo controle (**Figura 28**).

Figura 26. Efeito do NPD1 sobre o dano celular isquêmico neuronal, vascular e glial no hemisfério ipsilateral de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperfusão



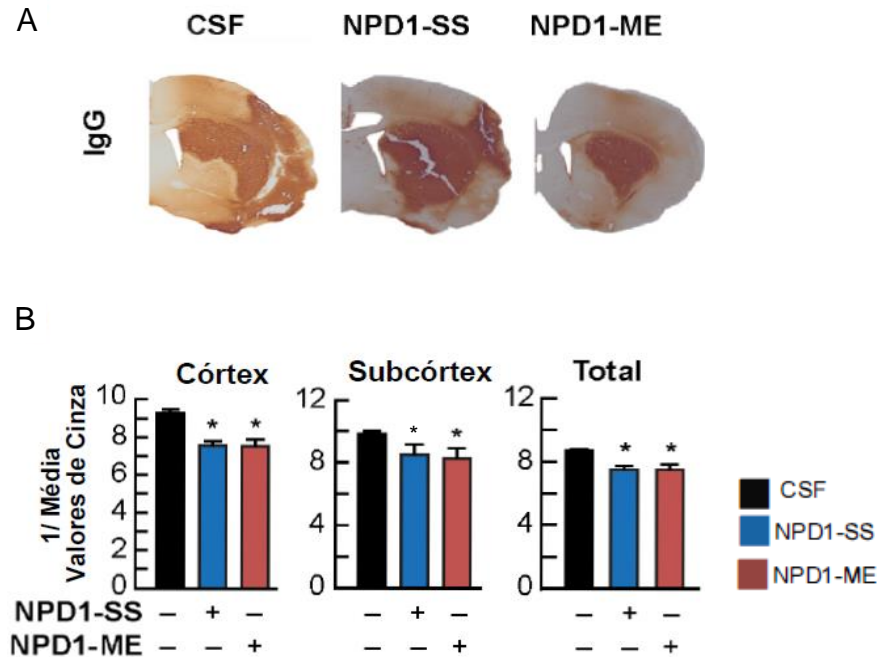
Secções representativas do hemisfério ipsilateral dos cérebros de ratos submetidos a 2h de MCAo e tratados com NPD1-SS, NPD1-ME (5µg/rato ICV) ou CSF 1h após 2h de MCAo 7 dias após isquemia-reperfusão imunomarcagem para NeuN (azul), SMI-71 (marrom) e GFAP (verde).

Figura 27. Efeito do NPD1 sobre o número de células NeuN⁺, SMI-71⁺ e GFAP⁺ na região cortical e subcortical de ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperusão



(A) Seções cerebrais representativas imunomarcadas para NeuN (marrom), SMI-71 (marrom claro) e GFAP (verde) de todos os grupos. (B) Diagrama de secção coronal do cérebro (bregma + 1.2 mm) mostrando as regiões de contagem de células positivas para NeuN, SMI-71 e GFAP no córtex (a, b e c) e estriado (s). (C) Quantificação de NeuN⁺, SMI-71⁺ e GFAP⁺ de todos os grupos. Dados expressos em média ± E.P.M. (n = 5 animais/grupo) *p < 0,05 versus grupo CSF; (ANOVA seguida do teste de Bonferroni)

Figura 28. Efeito do NPD1 sobre a ruptura da unidade neurovascular (UNV) em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperfusão



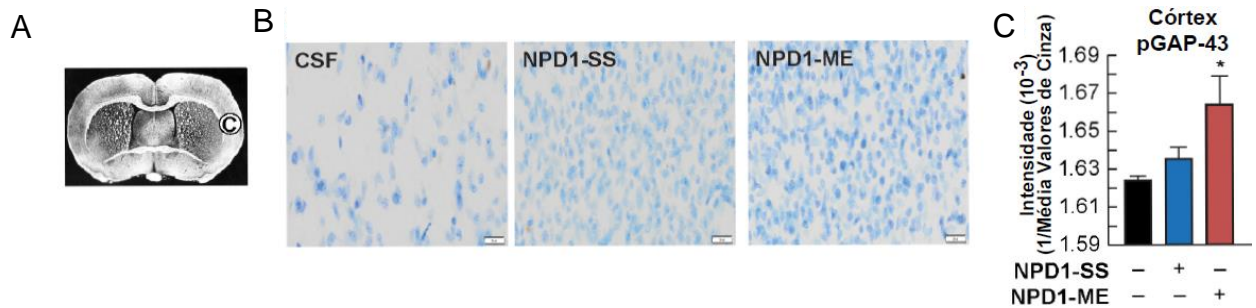
(A) A quebra da UNV foi avaliada por imunodeteção de imunoglobulina G (IgG) endógena dentro do parênquima cerebral. A imunoexpressão de IgG (marrom) indica quebra da UNV. (B) Quantificação da imunorreatividade de IgG no córtex, subcórtex e em todo o hemisfério direito (total). Os valores expressos em médias \pm E.P.M (n = 5–6 animais/grupo) * $p < 0,05$ versus grupo CSF; (ANOVA seguida do teste de Bonferroni)

5.13. Neuroprotectina D1 (NPD1) promoveu regeneração e aumento da densidade axonal 7 dias após MCAo

A Regeneração e densidade axonal foram avaliadas pela expressão da isoforma proteína GAP-43 fosforilada (pGAP-43). Uma proteína específica do tecido nervoso que é altamente expressa em neurônios durante o desenvolvimento e a regeneração nervosa estando diretamente associada ao crescimento axonal.

O tratamento com NPD1 aumentou significativamente (* $p < 0,05$) a intensidade da imunoexpressão de pGAP-43 nos neurônios da borda do infarto cortical em relação ao grupo controle CSF. A intensidade óptica da imunorreatividade para pGAP-43 foi grandemente aumentada pelo tratamento com NPD1-ME. Não houve diferenças significativas entre os grupos CSF e NPD1-SS ainda que este visualmente tenha apresentado uma tendência de aumento considerável dessa proteína (**Figura 29**).

Figura 29. Efeito de NPD1 sobre a regeneração e densidade axonal em ratos submetidos a oclusão da artéria cerebral média (MCAo) 7 dias após isquemia-reperfusão



Densidade axonal foi avaliada pela expressão da proteína fosforilada associada ao crescimento (pGAP-43). (A) Digrama coronal mostra o local onde medição da intensidade da imunomarcção para pGAP-43 foi avaliada. (B) Secções representativas mostrando a imunorreatividade para pGAP-43 na borda do infarto cortical. (C) O gráfico de barras mostra a intensidade da imunomarcção em todos os grupos. Os valores expressos em médias \pm E.P.M (n = 5–6 animais/grupo) * $p < 0,05$ versus grupo CSF; (ANOVA seguida do teste de Bonferroni)

6. DISCUSSÃO

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (PUFAs) exibem propriedades neuroprotetoras e representam um tratamento potencial para uma variedade de distúrbios neurodegenerativos e neurológicos. Nos últimos anos os PUFAs têm despertado de maneira crescente o interesse de muitos pesquisadores devido seus vários papéis na promoção da saúde e redução do risco de várias doenças.

Estudos recentes mostraram que os PUFAs e, em particular, o ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6, n-3) exerceu efeitos anti-inflamatórios potentes em estudos de neuroinflamação e neuroprotetores em modelos experimentais de isquemia-reperfusão cerebral focal em ratos (ZENDEDEL et al., 2015). O DHA é o precursor dos docosanoides, que são mediadores lipídicos bioativos e a neuroprotectina D1, sendo o primeiro membro identificado desse grupo de mediadores, inibe a expressão gênica pró-inflamatória induzida pelo estresse oxidativo e promove a sobrevivência celular (HONG et al., 2015).

Neste estudo, buscamos elucidar a fisiopatologia e mecanismos de neuroproteção mediados pelo DHA e NPD1 na isquemia-reperfusão cerebral focal. Em particular, investigou-se o impacto do tratamento com DHA sobre os mecanismos de reparo neurogênicos endógenos após acidente vascular cerebral isquêmico experimental e também os efeitos da administração direta (i.c.v.) de NPD1 sobre a área de penumbra isquêmica, angiogênese, neurogênese e integridade da barreira hematoencefálica.

Para atingir este objetivo, o modelo de MCAo em ratos SD, foi utilizado seguido de uma bateria de testes neurocomportamentais para a avaliação das funções motoras, análise histopatológica, marcadores para avaliação da integridade da BHE, imageamento por ressonância magnética para a determinação do volume de infarto e edema e marcação *in vivo* por BrdU em combinação com marcadores específicos de neurogênese e aplicação métodos de imuno-histoquímica para a determinação de expressão proteica.

Nossos resultados demonstram que o tratamento com DHA e NPD1 promovem o aumento da neurogênese e angiogênese, reduzem o dano tecidual isquêmico, diminuem a degradação da BHE e protegem a penumbra isquêmica quando aplicados 1h após 2h de MCAo. De modo geral, a diminuição dos volumes de infarto observada após tratamento com ambos compostos, foram refletidos na significativa melhora da

recuperação neurológica pelos animais tratados frente a uma bateria de testes que avaliaram a evolução de suas funções motoras após isquemia-reperfusão em diferentes espaços de tempo.

Neste estudo, foi demonstrado que o tratamento com DHA reduziu significativamente área de infarto em múltiplos níveis de bregma, assim como o volume total, cortical e subcortical do infarto em até 2 semanas após MCAo em comparação ao grupo salina. Estes resultados suportam estudos de neuroproteção realizados anteriormente, que demonstraram a capacidade do DHA em melhorar significativamente os achados histopatológicos após AVC isquêmico experimental (BELAYEV et al., 2011; EADY et al., 2012).

Preservar tecido viável após o AVC isquêmico é fundamental na recuperação e restauração da função cerebral adequada e, portanto, maior objetivo de terapias neuroprotetoras. A administração de DHA não só diminuiu significativamente a perda tecidual em relação ao hemisfério não lesionado, mas também aumentou grandemente a quantidade de tecido viável no hemisfério isquêmico em comparação com o grupo controle ao decorrer do período experimental de 2 e 4 semanas após isquemia-reperfusão. Estes resultados sugerem a eficácia do DHA sobre a neuroproteção de neurônios frente subprodutos neurotóxicos produzidos pela isquemia cerebral. Além disso, a redução do volume de infarto associado com redução da perda de tecido viável está diretamente correlacionada com a melhoria da função neurocomportamental em animais tratados com DHA.

AVC isquêmico focal leva ao comprometimento das funções sensório-motoras e cognitivas, com 70-80% dos pacientes apresentando hemiparesia imediatamente após a isquemia (PATEL; MCMULLEN, 2017). Os déficits de função neurológica são indicadores importantes da progressão e gravidade do AVC isquêmico em modelos experimentais de isquemia-reperfusão cerebral, bem como em seres humanos vítimas dessa grave condição. A avaliação funcional crônica da função neurocomportamental é considerada primordial na melhoria da tradução da pesquisa laboratorial para a prática clínica hospitalar (FRERET et al., 2011).

Diversos testes de avaliação da função neurológica aplicados na pesquisa laboratorial seguem critérios clínicos pré-estabelecidos. Como o objetivo final de qualquer

terapia para o AVC isquêmico é a restauração das funções neurocomportamentais, dois testes para a avaliação sensorio-motora foram utilizados para detectar déficits neurológicos após acidente vascular cerebral experimental. A bateria de testes neurocomportamentais utilizada nesse estudo é amplamente validada na literatura e avaliou a presença de déficits no reflexo postural e na integração sensorio-motora em resposta a estímulos proprioceptivos, visuais e táteis (BELAYEV et al., 1996).

O tratamento com DHA melhorou a recuperação neurológica total destacada pela evolução da recuperação e melhora do reflexo postural e das respostas táteis, proprioceptivas e visuais durante o período de 2 e 4 semanas após isquemia-reperusão. Estes resultados mostram que o tratamento com DHA tem um efeito positivo na recuperação neurológica funcional, que está refletida na recuperação e melhora dos parâmetros histopatológicos. Esses achados são fortemente apoiados por estudos prévios de isquemia-reperusão utilizando o DHA como tratamento, que reforçam a capacidade neuroprotetora desse composto, bem como atenuação de déficits neurocomportamentais (BELAYEV et al., 2015; HONG et al., 2015).

Os resultados do presente estudo fornecem evidências que apoiam a extensão dos efeitos neuroprotetores do DHA na isquemia-reperusão cerebral focal que vão ao encontro de achados presentes na literatura. No entanto, infelizmente, ainda é pouco compreendido como o DHA induz a sobrevivência celular, bem como a melhora funcional e histológica na isquemia-reperusão cerebral focal. Portanto, foram avaliadas vias específicas e mecanismos através pelos quais o DHA protege contra o dano isquêmico experimental em ratos.

O neurotrauma, especialmente a isquemia cerebral, induz a ativação de mecanismos moleculares endógenos de reparo celular que auxiliam o cérebro em sua recuperação. A lesão isquêmica desencadeia uma resposta neurogênica, que atua por meio da ativação da proliferação de células progenitoras neurais e migração destas para a área de lesão no cérebro. A ativação da neurogênese estimulada pela injúria isquêmica, é uma resposta inata do cérebro na tentativa de restaurar a homeostase e a função neurológica após lesão cerebral e, portanto, a sua estimulação representa um alvo terapêutico em potencial para o tratamento do AVC isquêmico (KERNIE; PARENT, 2010; MOLINA-HOLGADO; MOLINA-HOLGADO, 2010).

O efeito mediado pelo tratamento com DHA sobre a neurogênese no GD, zona SVZ e na região de peri-infarto cortical foi investigado por meio da análise da incorporação de BrdU associado a imunomarcadores específicos para diferentes estágios de desenvolvimento neural após isquemia-reperfusão cerebral focal.

A imunomarcagem com BrdU associada a marcadores de fase celular específicos é capaz de identificar a proliferação, migração e diferenciação de células neuronais precursoras frente ao dano mediado pela isquemia-reperfusão cerebral focal. BrdU é um marcador frequentemente utilizado para monitorar a proliferação e diferenciação celular, pois é um análogo da timidina que se incorpora ao DNA das células em divisão durante a fase S (VON BOHLEN UND HALBACH, 2007).

No entanto, seu uso apresenta algumas limitações, BrdU pode marcar células não relacionadas ao processo de neurogênese, como células pós-mitóticas que estão passando por reparo do DNA e/ou em vias de apoptose. Foi realizada análise imunohistoquímica com dupla marcação para BrdU e Ki-67 para avaliar o efeito do DHA sobre a proliferação contínua de células neurais precursoras recém-formadas após lesão isquêmica, já que o marcador ki-67 é amplamente expresso durante o ciclo celular mitótico, porém não é detectado durante o processo de reparo do DNA (VON BOHLEN UND HALBACH, 2011), o que nos permitiu visualizar se o tratamento com DHA leva a um aumento da proliferação de células neuronais precursoras em nichos neurogênicos.

Os resultados obtidos indicam que o tratamento com DHA aumentou significativamente o número de células BrdU⁺/Ki67⁺ no ápice, lâmina lateral (porção supra-piramidal), lâmina medial (porção infra-piramidal) do GD e GD total, SVZ e borda do infarto cortical em comparação com o grupo controle, 2 semanas após MCAo. O efeito mediado pelo DHA sobre a população de células neuronais precursoras no GD e na zona SVZ sugere uma modulação positiva dessas regiões neurogênicas após isquemia-reperfusão. Já o aumento do número de células duplamente marcadas BrdU⁺/Ki67⁺ na zona de peri-infarto cortical nos leva a inferir que DHA estimula a contínua proliferação e migração de células tronco neurais para a área de infarto. A proliferação e migração dessas células progenitoras, pode ser caracterizada com a primeira linha de resposta reparativa endógena a lesão isquêmica, porém, os resultados obtidos nos levam a acreditar que o tratamento com DHA está potencializando essa resposta e aumentando

a quantidade de células ativadas pelo processo de neurogênese após isquemia-reperfusão cerebral focal.

O papel do DHA nos diferentes estágios de diferenciação neuronal foi avaliado pela marcação de células precursoras neuronais com BrdU e DCX. DCX é um marcador que está presente nos neuroblastos migratórios e nos neurônios jovens/imaturos (LINDVALL; KOKAIA, 2015; RAO; SHETTY, 2004). A dupla marcação com BrdU/DCX nos permitiu determinar se a terapia com DHA impactou o desenvolvimento das novas células neurais precursoras e suas subsequentes linhagens neuronais.

Os resultados desse trabalho mostraram que o tratamento com DHA também aumentou significativamente o número de células BrdU⁺/DCX⁺ no ápice, lâmina lateral, lâmina medial do GD e GD total, SVZ e borda do infarto cortical em comparação com o grupo controle 2 semanas após MCAo. Foi observado que as células BrdU/DCX⁺ do GD dos animais tratados com DHA apresentaram processos dendríticos mais longos na camada granular direcionados à camada molecular do giro denteado. Esses achados indicam que DHA direcionou o desenvolvimento das células neurais precursoras para linhagens neuronais após lesão cerebral isquêmica, promovendo persistentemente o desenvolvimento e diferenciação desses jovens neurônios na borda do infarto cortical de forma sustentada em até 4 semanas após tratamento.

A determinação do fenótipo de diferenciação celular é um passo essencial para a caracterização do processo de neurogênese. Para confirmar a hipótese de que DHA promove a indução da diferenciação de células neurais precursoras, buscamos determinar o fenótipo das células recém-formadas por meio da dupla marcação com BrdU e NeuN. NeuN é uma proteína expressa e detectada na maioria dos neurônios do sistema nervoso e serve como um marcador para neurônios maduros pós-mitóticos e recém-diferenciados (VON BOHLEN UND HALBACH, 2011).

Observou-se que o tratamento com DHA promoveu o aumento do número de células BrdU⁺/NeuN⁺ no ápice, lâmina lateral, lâmina medial do GD e GD total, SVZ e borda do infarto cortical em comparação com o grupo controle, 2 semanas após MCAo. Estes resultados indicam que os neurônios maduros recém-diferenciados por DHA integraram-se com sucesso a circuitos neuronais pré-existentes na borda isquêmica. Embora o presente estudo forneça evidências que apoiem a neurogênese aumentada

por DHA, seguida por lesão isquêmica, mais estudos são necessários para validar se esses neurônios recém-diferenciados são completamente funcionais dentro de circuitos neurais.

O aspecto mais promissor dos resultados obtidos é a relação descoberta entre a melhora neurológica funcional e histológica após isquemia-reperfusão cerebral focal com o aumento na atividade neurogênica em várias áreas importantes do cérebro de ratos tratados com DHA. Sugerindo que esses processos são responsáveis pelo reparo endógeno de circuitos neuronais danificados pela lesão isquêmica e que o mecanismo de neurogênese está sendo regulado positivamente pela administração de DHA de forma a atenuar os déficits neurocomportamentais e parâmetros histopatológicos resultantes da injúria isquêmica.

O efeito do DHA sobre parâmetros de neuroinflamação, apoptose e sobrevivência celular. Também foi investigado se a administração de DHA modula a ativação de micróglia/macrófagos e astrócitos reativos em um período crônico de 4 semanas após isquemia-reperfusão cerebral focal. Os resultados encontrados demonstram que a administração de DHA reduz significativamente a presença de micróglia ativada e astrócitos reativos, assim como, reduz a morte celular por apoptose e atenua a morte neuronal nas regiões de borda de infarto cortical e subcortical em até 4 semanas após IR em comparação com o grupo controle.

Recentemente nosso grupo demonstrou a persistência da neuroproteção induzida por DHA com melhorias neurológicas funcionais e histológicas em até 3 semanas após isquemia-reperfusão cerebral focal (HONG et al., 2014). No entanto, o efeito do DHA na ativação de micróglia/macrófagos e astrócitos reativos na borda de infarto em um período de sobrevivência crônica após lesão cerebral isquêmica ainda não tinha sido investigado. A ativação de micróglia/macrófagos é responsável pela iniciação da cascata inflamatória isquêmica (HU et al., 2012).

Astrócitos quando reativos produzem citocinas pró-inflamatórias, que podem contribuir para a morte de células neuronais diretamente por meio da indução de apoptose ou indiretamente, via produção local elevada de óxido nítrico secundária à ativação de iNOS nestas células. Astrócitos reativos também produzem fatores quimioatrativos, quimiocinas, que fazem o recrutamento de células do sistema

imunológico para o local do infarto, o que pode promover o aumento da lesão isquêmica (LIU; CHOPP, 2017).

Por outro lado, mediadores inflamatórios neuroprotetores também são secretados por astrócitos ativados e a ativação destas células também evita a propagação de danos cerebrais isquêmicos, a depender da polarização astrocitária em direção a um fenótipo específico. O fenótipo induzido pelo AVC isquêmico parece ser regulado pelos neurônios circulantes e micróglia. Portanto, a resposta neuroinflamatória dos astrócitos frente à isquemia cerebral parece ser multifacetada e aparentemente desempenha um papel dual. A elucidação dos mecanismos que induzem astrócitos a produzir mediadores inflamatórios deletérios *versus* mediadores protetores é um passo essencial no desenvolvimento de uma abordagem direcionada para reduzir efetivamente a lesão de infarto e para melhorar a recuperação e a regeneração após o AVC isquêmico focal (AMANTEA et al., 2015; RUSNAKOVA et al., 2013).

No presente estudo, a presença maciça de micróglia/macrófagos ativada detectada pelo aumento da intensidade de fluorescência emitida por células Iba-1⁺ positivas foi observada juntamente com um grande número de astrócitos reativos nas bordas de infarto cortical e subcortical em ratos pertencentes ao grupo controle. Em contraste, menos micróglia/macrófagos ativadas e iba-1⁺ positivas, assim como, um número significativamente menor de astrócitos reativos nas regiões de borda de infarto, foram observados nos animais tratados com DHA em comparação com o grupo salina, 4 semanas após tratamento. Estes resultados implicam na persistência duradoura dos efeitos anti-inflamatórios mediados por DHA na sobrevivência crônica após isquemia-reperfusão cerebral focal.

Estes resultados estão em concordância com um outro estudo publicado que mostrou a redução do número de astrócitos reativos GFAP⁺ induzida pela neuroproteção mediada por 3-n-butil-ftalida (NBP), um material racêmico quiral extraído das sementes de aipo, na isquemia cerebral crônica. No entanto, mais estudos são necessários para a análise espaço-temporal em relação ao *clearance* de astrócitos reativos no tecido isquêmico crônico (XU et al., 2012).

DHA promoveu ainda a sobrevivência celular reduzindo a apoptose neuronal, e a atenuação da morte de neurônios dentro da área de infarto no córtex e subcórtex

conforme observado pela redução da marcação fluorescente pela coloração de Hoechst, utilizada como marcador de apoptose neuronal e o aumento do número de células NeuN⁺ quando comparado com o grupo controle. Este achado evidencia o efeito do DHA sobre a modulação das vias de morte celular. Muito provavelmente, estes efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos exibidos pelo DHA estão associados a ação de seus mediadores lipídicos bioativos como a neuroprotectina D1 (NPD1) (BAZAN, 2009a).

Baseados em achados anteriores, no presente estudo, investigamos se a administração direta intracerebroventricular (i.c.v.) de NPD1 possui atividade neuroprotetora contra isquemia-reperfusão cerebral focal em ratos SD. O NPD1 é um derivado estereoespecífico do DHA e que durante a isquemia-reperfusão é formado através da ação de enzimas lipoxigenases que agem sobre o DHA livre. O NPD1 é uma molécula de sinalização pró-sobrevivência celular e anti-apoptótica, que age inibindo a expressão gênica pró-inflamatória induzida pelo estresse oxidativo e promovendo a sobrevivência celular através de regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas e negativa de proteínas pró-apoptóticas (BAZAN, 2009b; MARCHESSELLI et al., 2010).

O tratamento com ambas formas de NPD1 (5µg/por rato ICV) reduziu significativamente o escore neurológico total melhorando a evolução das funções neurológicas dos animais tratados em relação ao grupo controle durante o período de 7 dias após isquemia-reperfusão. A melhora significativa do déficit motor está diretamente associada com a redução do volume da lesão de infarto observada pelo imageamento por ressonância magnética (MRI) *ex vivo* dos cérebros desses animais, conjuntamente com a avaliação histopatológica.

As intervenções terapêuticas para o AVC isquêmico têm como objetivo primordial a proteção e preservação da área de penumbra isquêmica. O imageamento da área de penumbra é uma estratégia importante para detectar tecidos em risco e selecionar pacientes, que se apresentam além da janela de tempo de 3 horas para terapia, especialmente quando até 44% dos pacientes podem ainda possuir tecido penumbral viável em até 18h após o AVC isquêmico. A grande vantagem do uso da ressonância magnética no AVC isquêmico agudo é o fornecimento de informações clínicas mais detalhadas que podem auxiliar os médicos no diagnóstico, tratamentos e prognóstico desses pacientes (DONNAN et al., 2009; EBINGER et al., 2009).

Nesse estudo, o imageamento por ressonância magnética foi usado para a detecção de alterações no conteúdo de água e difusão que caracterizam o AVC isquêmico agudo. Nossos resultados mostram que ambos tratamentos com NPD1 (por via ICV) foi capaz de reduzir drasticamente o volume do infarto cortical (região de penumbra) em relação ao grupo controle. NPD1 foi eficaz ainda na redução significativa do volume de lesão subcortical e total.

A análise histopatológica de todos os grupos experimentais está em consonância com os resultados obtidos no MRI. Neuroproteção significativa foi observada no córtex (a área de penumbra) e também na área subcortical dos grupos tratados com NPD1. Áreas de infartos menores com menos dano pancelular e áreas mais densas de neurônios eosinofílicos ao longo da margem do infarto foram detectados em ambos os grupos tratados com NPD1. Ambos os tratamentos com NPD1 reduziram de forma consistente e significativa os volumes de lesão cortical, subcortical e total em até 95%, 78% e 89% respectivamente no período de 7 dias após isquemia-reperusão.

Esses resultados mostram que o tratamento com NPD1 resultou na neuroproteção e preservação de tecido viável (penumbra), o que é uma questão crítica no tratamento de pacientes vítimas de AVC isquêmico e na sobrevida crônica após isquemia cerebral focal, refletindo na melhora consistente das funções neurológicas e motoras destes.

A análise lipídômica demonstrou a síntese de NPD1 e 17-HDHA foi observado após tratamento com DHA e foi potencializada na penumbra isquêmica 5 h após MCAo. Além disso, a expressão aumentada de 14-HDHA, precursor da maresina-1, uma importante pró-resolvina anti-inflamatória, também foi detectada na área de penumbra.

Esses resultados mostram que NPD1 é produzido endogenamente no cérebro lesionado por isquemia-reperusão cerebral focal após tratamento com DHA. O mediador lipídico NPD1 proporciona um mecanismo específico para compreender a modulação mediada por DHA sobre a neuroinflamação e neuroproteção. Assim, o NPD1 é um mediador chave na bioatividade neuroprotetora exercida pelo DHA no SNC. A deficiência de NPD1 e da enzima envolvida em sua formação, 15-LOX-1, tem sido observada no cérebro de pacientes com doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (BAZAN; MOLINA; GORDON, 2011).

A isquemia cerebral inicia uma complexa cascata de eventos celulares,

moleculares e metabólicos que levam a danos cerebrais irreversíveis (IADECOLA; ANRATHNER, 2012). Conforme o infarto progride, as lesões neurovasculares pioram. O termo neuroproteção é tipicamente utilizado para descrever a proteção de neurônios do ambiente neurotóxico que ocorre durante a isquemia. No entanto, os complexos eventos moleculares que ocorrem após o AVC isquêmico requerem a participação de múltiplos fatores e células, incluindo células gliais, vasculares e inflamatórias.

A distribuição histológica dos marcadores moleculares no hemisfério cerebral lesionado pela isquemia-reperfusão focal dos animais tratados com NPD1 diferiu significativamente dos animais pertencentes ao grupo controle. O tratamento com NPD1 aumentou o número de neurônios e astrócitos sobreviventes e a densidade de vasos sanguíneos na região de penumbra juntamente com formação paralela de tecido cicatricial mais denso rico em GFAP, nesta mesma região no hemisfério ipsilateral, 7 dias após isquemia-reperfusão experimental.

Estes resultados indicam que o tratamento com NPD1 protege não apenas neurônios, mas também astrócitos, que são críticos para a manutenção e proteção de neurônios através da secreção de mediadores neurotróficos (AMANTEA et al., 2015). O efeito mediado por NPD1 na promoção da sobrevivência celular pode estar diretamente associado à sua capacidade de regular positivamente a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL e negativamente a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bad em resposta ao estresse oxidativo celular e ativação de citocinas, levando a formação de um transcriptoma pró-sobrevivência. NPD1 atua ainda inibindo a ativação de NF- κ B e a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), além de modular a expressão gênica pró-inflamatória, suprimindo a transcrição de mediadores inflamatórios e inibindo a infiltração leucocitária para a área isquêmica durante a isquemia-reperfusão cerebral (ASATRYAN; BAZAN, 2017; BAZAN; MOLINA; GORDON, 2011).

Os astrócitos são células chave na resposta de reparo do tecido isquêmico, exercendo um papel dualista no curso da isquemia cerebral. Na fase inicial da isquemia, os astrócitos reativos liberam citocinas e ativam metaloproteinases (MMPs) que contribuem para a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) e formação de edema de origem vasogênica; enquanto que em fases de reparo tardio, eles realizam a captação de glutamato extracelular, regeneração de BHE e remodelamento neurovascular e

liberação de fatores neurotróficos (AMANTEA et al., 2015; JIN; YANG; LI, 2010). Astrócitos são ainda responsáveis pela formação de cicatrizes gliais constituídas por astrócitos reativos com processos alongados em direção ao *core* isquêmico na fase crônica após isquemia cerebral, que impedem a disseminação de danos celulares e da inflamação (AMANTEA et al., 2015; JIN; YANG; LI, 2010; LIU; CHOPP, 2017).

O processo de angiogênese exerce um papel crítico na melhora da recuperação funcional neurológica pós-AVC isquêmico. Mais do que isso, alguns autores têm mostrado uma interação ou dependência entre a neurogênese induzida pela lesão isquêmica e a angiogênese (ANGELS FONT et al., 2010; MOGOANTĂ et al., 2010; RUAN et al., 2015). Portanto, elucidar os mecanismos subjacentes dessa associação é de grande importância, podendo fornecer informações-chaves para o desenvolvimento de novas terapias neurorestaurativas para o AVC isquêmico.

No atual estudo o tratamento com NPD1 aumentou significativamente a densidade vascular, assim como favoreceu a regeneração nervosa por meio do aumento da densidade axonal e o número de neurônios sobreviventes na área de penumbra em relação ao grupo controle 7 dias após isquemia-reperfusão. De forma, que o aumento da densidade dos vasos sanguíneos provavelmente facilita a neurogênese e a sinaptogênese, que, por sua vez, contribuem para melhorar o reparo e a recuperação funcional dessa área.

A isquemia-reperfusão cerebral focal experimental aumenta a neurogênese e a angiogênese, mas o mecanismo como as células endoteliais influenciam a neurogênese induzida por essa condição ainda é desconhecido. A principal via de migração das células neurais progenitoras (NPCs) para sítios de lesão durante o processo de neurogênese, está intimamente associada aos vasos sanguíneos, sugerindo que essa interação fornece uma orientação direcional às NPCs (BHATTACHARJEE et al., 2017). A origem da formação de novos vasos sanguíneos e o significado da neovascularização e neurogênese são questões importantes não respondidas na fisiopatologia do AVC isquêmico e sua contribuição para a recuperação.

O dano vascular durante a isquemia cerebral ocorre de forma precoce e progride de maneira bifásica. A lesão cerebral isquêmica leva ao aumento da permeabilidade da BHE e, em seguida, desencadeia uma cascata de eventos, levando à formação de

edema, lesão cerebral secundária e desfechos neurológicos ruins para os pacientes acometidos. O aumento da permeabilidade da BHE pode explicar a transformação hemorrágica do AVC isquêmico, fenômeno que ocorre principalmente nas primeiras 24 horas após um episódio de isquemia cerebral (MOGOANTĂ et al., 2010; YANG; ROSENBERG, 2011).

Clinicamente, a ruptura da BHE ocorre em mais de um terço dos pacientes vítimas do AVC isquêmico e está associada a maiores taxas de mortalidade e menores taxas de sobrevivência dos indivíduos acometidos (ROSENBERG, 2012). Como a isquemia cerebral e o dano da BHE estão intimamente correlacionados, as abordagens para proteger a integridade da BHE de forma a reduzir a sua permeabilidade poderiam ajudar a elucidar o mecanismo fisiopatológico da isquemia cerebral, melhorando a eficácia do tratamento.

Após a isquemia cerebral, a integridade da unidade neurovascular (UNV) é comprometida, permitindo a entrada descontrolada de moléculas no parênquima cerebral, podendo piorar o dano causado pela isquemia (BHATTACHARJEE et al., 2017). Nesse estudo, a ruptura mediada pela lesão isquêmica da UNV foi avaliada por meio da detecção da infiltração de IgG endógena no parênquima cerebral. Do nosso conhecimento, até o momento nenhum estudo anterior tinha avaliado o efeito de NPD1 na disfunção da BHE, após lesão por isquemia-reperfusão cerebral focal.

Nossos resultados indicam que a administração de NPD1 protege de forma significativa contra a ruptura da BHE induzida por isquemia-reperfusão, conforme evidenciado pela redução da imunorreatividade de IgG no córtex, subcórtex e em todo hemisfério direito em comparação com o grupo controle. Estes resultados apontam claramente para o efeito protetor de NPD1 a BHE, reduzindo a sua permeabilidade evitando a entrada de mediadores neurotóxicos no parênquima cerebral e, portanto, colaborando para a redução do dano isquêmico. Esses resultados corroboram com Hong e colaboradores (2015) que demonstraram o efeito benéfico do DHA na BHE comprometida pelo dano causado pela reperfusão isquêmica tardia (HONG et al., 2015). Tendo por base que o NPD1 é um mediador bioativo derivado do DHA, ambos resultados se complementam e em grande parte explicam o efeito neuroprotetor do DHA.

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a administração de DHA a partir de 1h após 2h de oclusão da artéria cerebral média

(MCAo) apresenta efeito neuroprotetor reduzindo a área e o volume de infarto cerebral, reduz ainda a perda tecidual relativa e aumenta tecido residual viável resultando na recuperação neurocomportamental com conseqüente melhoria das funções neurológicas motoras. Tratamento com DHA promove o aumento da neurogênese em importantes nichos neurogênicos do hipocampo, reduz a apoptose e a neuroinflamação nas regiões de infarto cortical e subcortical nos períodos experimentais de duas e quatro semanas após isquemia-reperfusão cerebral focal. Além disso a administração de DHA estimula a síntese endógena de NPD1 na área de penumbra isquêmica na 5ª hora após isquemia-reperfusão.

Este estudo também indica que a administração de NPD1 exerce efeitos semelhantes ao DHA frente a isquemia-reperfusão cerebral focal experimental, já que o NPD1 desempenhou importante efeito neuroprotetor reduzindo área e volume de infarto cerebral, proteção da área de penumbra com recuperação neurocomportamental. O tratamento com NPD1 promoveu a sobrevivência celular, angiogênese, regeneração nervosa e redução da permeabilidade da BHE no período de 7 dias após isquemia-reperfusão.

Portanto as terapias experimentais utilizadas nesse estudo apresentam potencial terapêutico para guiar futuros estudos clínicos e se mostram promissoras para o tratamento efetivo do acidente vascular cerebral isquêmico.

Apesar de que o modelo de isquemia-reperfusão cerebral focal em ratos ser amplamente utilizado na literatura, os achados documentados nesse estudo pré-clínico precisam ser corroborados por estudos clínicos placebo-controlados para avaliar a real eficácia adjuvante do DHA no AVC isquêmico.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram os efeitos neuroprotetores do DHA e NPD1 frente a isquemia-reperfusão cerebral focal. Além disso verificou-se que a neuroproteção mediada por esses dois compostos é realizada por meio de mecanismos específicos como aumento da neurogênese endógena, redução da permeabilidade da barreira hematoencefálica e modulação da neuroinflamação. Os resultados encontrados fornecerão a base para futuras pesquisas sobre a tradução das possíveis aplicações terapêuticas do DHA e NPD1 para o tratamento do AVC isquêmico no cenário clínico.

Em resumo, os principais achados desse estudo incluem:

1. DHA administrado a partir de 1h após 2h de oclusão da artéria cerebral média (MCAo) apresenta efeito neuroprotetor reduzindo a área e o volume de infarto cerebral, reduz ainda a perda tecidual relativa e aumenta tecido residual viável resultando na recuperação neurocomportamental com consequente melhoria das funções neurológicas motoras.
2. DHA induz o aumento da neurogênese em importantes nichos neurogênicos do hipocampo, reduz a apoptose e a neuroinflamação nas regiões de infarto cortical e subcortical nos períodos experimentais de duas e quatro semanas após isquemia-reperfusão cerebral focal.
3. DHA estimula a síntese endógena na área de penumbra isquêmica na 5^a hora após isquemia-reperfusão.
4. NPD1 exerce efeitos semelhantes ao DHA frente a isquemia-reperfusão cerebral focal experimental. NPD1 desempenhou importante efeito neuroprotetor reduzindo área e volume de infarto cerebral, proteção da área de penumbra levando a recuperação neurocomportamental. Reduzindo área e volume de infarto cerebral, proteção da área de penumbra levando a recuperação neurocomportamental após isquemia-reperfusão.
5. NPD1 promove a sobrevivência celular, angiogênese, regeneração nervosa e redução da permeabilidade da BHE no período de 7 dias após isquemia-reperfusão.

REFERÊNCIAS

- ABROUS, D. N.; WOJTOWICZ, J. M. Interaction between neurogenesis and hippocampal memory system: New vistas. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 6, p. 1–24, 2015.
- ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders. **Neurochemical research**, v. 30, n. 1, p. 15–23, jan. 2005.
- ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. **BMB reports**, v. 41, n. 8, p. 560–7, 2008.
- ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative Stress and Its Role in the Pathogenesis of Ischaemic Stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, n. 6, p. 461–470, dez. 2009.
- ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science (New York, N.Y.)**, v. 135, n. 3509, p. 1127–8, 30 mar. 1962.
- AMANTEA, D. et al. Rational modulation of the innate immune system for neuroprotection in ischemic stroke. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 147, 29 abr. 2015.
- ANGELS FONT, M.; ARBOIX, A.; KRUPINSKI, J. Angiogenesis, Neurogenesis and Neuroplasticity in Ischemic Stroke. **Current Cardiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 238–244, 2010.
- ARVIDSSON, A. et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nature Medicine**, v. 8, n. 9, p. 963–970, set. 2002.
- ASATRYAN, A.; BAZAN, N. G. Molecular mechanisms of signaling via the docosanoid neuroprotectin D1 for cellular homeostasis and neuroprotection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 30, p. 12390–12397, 2017.
- ASTRUP, J. et al. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. **Stroke**, v. 8, n. 1, p. 51–7, [s.d.].
- BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiology of Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2004.
- BARINKA, F.; DRUGA, R. Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review. **Physiological Research**, v. 59, n. 5, p. 665–677, 2010.
- BARRETO, G. et al. Astrocytes: Targets for Neuroprotection in Stroke. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 164–173, 2011.

BAZAN, N. G. Lipid Signaling in Neural Plasticity, Brain Repair, and Neuroprotection. **Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 1, p. 089-104, ago. 2005.

BAZAN, N. G. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S400–S405, 2009a.

BAZAN, N. G. Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 2–3, p. 205–211, set. 2009b.

BAZAN, N. G. et al. Novel aspirin-triggered neuroprotectin D1 attenuates cerebral ischemic injury after experimental stroke. **Experimental Neurology**, v. 236, n. 1, p. 122–130, 2012.

BAZAN, N. G.; CALANDRIA, J. M.; GORDON, W. C. Docosahexaenoic acid and its derivative neuroprotectin D1 display neuroprotective properties in the retina, brain and central nervous system. **Nestle Nutrition Institute workshop series**, v. 77, p. 121–31, 2013.

BAZAN, N. G.; MOLINA, M. F.; GORDON, W. C. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. **Annual Review of Nutrition**, v. 31, p. 321–351, ago. 2011.

BELAYEV, L. et al. Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat by Intraluminal Suture: Neurological and Pathological Evaluation of an Improved Model. **Stroke**, v. 27, n. 9, p. 1616–1623, 1 set. 1996.

BELAYEV, L. et al. LAU-0901, a novel platelet-activating factor antagonist, is highly neuroprotective in cerebral ischemia. **Experimental Neurology**, v. 214, n. 2, p. 253–258, 2008.

BELAYEV, L. et al. A novel neurotrophic therapeutic strategy for experimental stroke. **Brain Research**, v. 1280, p. 117–123, 2009a.

BELAYEV, L. et al. Robust Docosahexaenoic Acid-Mediated Neuroprotection in a Rat Model of Transient Focal Cerebral Ischemia. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 40, n. 9, p. 3121–3126, set. 2009b.

BELAYEV, L. et al. Docosahexaenoic Acid Therapy of Experimental Ischemic Stroke. **Translational Stroke Research**, v. 2, n. 1, p. 33–41, 2011.

BELAYEV, L. et al. Superior Neuroprotective Efficacy of LAU-0901, a Novel Platelet-Activating Factor Antagonist, in Experimental Stroke. **Translational Stroke Research**, v. 3, n. 1, p. 154–163, 2012.

BELAYEV, L. et al. A novel therapeutic strategy for experimental stroke using docosahexaenoic acid complexed to human albumin. **Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2015.

BELAYEV, L. et al. Docosanoids Promote Neurogenesis and Angiogenesis, Blood-Brain Barrier Integrity, Penumbra Protection, and Neurobehavioral Recovery After Experimental Ischemic Stroke. **Molecular Neurobiology**, 1 jun. 2018.

BELAYEV, L.; ENDRES, M.; PRINZ, V. Focal Cerebral Ischemia in the Mouse and Rat Using the Intraluminal Suture–Filament Model. In: DIRNAGL, U. (Ed.). **Rodent Models of Stroke**. Second Ed ed. Totowa, NJ: Humana Press, Totowa, NJ, 2010. p. 29–40.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, n. 10, p. e146–e603, 7 mar. 2017.

BHATTACHARJEE, S. et al. Elovans are a novel class of homeostatic lipid mediators that protect neural cell integrity upon injury. **Science advances**, v. 3, n. 9, p. e1700735, 27 set. 2017.

BRANDT, M. D. et al. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 24, n. 3, p. 603–613, nov. 2003.

BUTTERFIELD, D. A.; BADER LANGE, M. L.; SULTANA, R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1801, n. 8, p. 924–9, ago. 2010.

CALDERON, F.; KIM, H. Y. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 4, p. 979–988, 2004.

CAMP, A. J.; WIJESINGHE, R. Calretinin: Modulator of neuronal excitability. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 11, p. 2118–2121, nov. 2009.

CHEN, C.-H.; JOSHI, A. U.; MOCHLY-ROSEN, D. The Role of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2 (ALDH2) in Neuropathology and Neurodegeneration. **Acta neurologica Taiwanica**, v. 25(4), p. 111–123, 15 dez. 2016.

CHEN, S. et al. Early Abrogation of Gelatinase Activity Extends the Time Window for tPA Thrombolysis after Embolic Focal Cerebral Ischemia in Mice. **eNeuro**, v. 10, n. June, p. 391–17, 2018.

CHENG, N. T.; KIM, A. S. Intravenous Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke Within 3 Hours Versus Between 3 and 4.5 Hours of Symptom Onset. **The Neurohospitalist**, v. 5, n. 3, p. 101–109, 2015.

COLUCCI-D'AMATO, L.; BONAVIDA, V.; DI PORZIO, U. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. **Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 27, n. 4, p. 266–70, set. 2006.

CRONENWETT, J. L.; JOHNSTON, K. W.; RUTHERFORD, R. B. **Rutherford's vascular surgery**. [s.l.] Saunders/Elsevier, 2014.

CRUPI, R.; MARINO, A.; CUZZOCREA, S. n-3 Fatty Acids: Role in Neurogenesis and Neuroplasticity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 24, p. 2953–2963, 1 jul. 2013.

CURTIS, M. A.; LOW, V. F.; FAULL, R. L. M. Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: A comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 7, p. 990–1005, 2012.

DARNELL, D.; GILBERT, S. F. Neuroembryology. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.**, v. 6, n. 1, p. 1–21, 2017.

DE LA TORRE, J. C. Cardiovascular risk factors promote brain hypoperfusion leading to cognitive decline and dementia. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, v. 2012, p. 367516, 2012.

DENNIS, C. V. et al. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 42, n. 7, p. 621–638, dez. 2016.

DONNAN, G. A. et al. Stroke. **Lancet (London, England)**, v. 371, n. 9624, p. 1612–23, 10 maio 2008.

DONNAN, G. A. et al. Penumbra selection of patients for trials of acute stroke therapy. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 3, p. 261–269, 2009.

DONNAN, G. A. et al. How to make better use of thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 7, p. 400–409, 2011.

DYALL, S. C. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, n. APR, p. 1–15, 2015.

DYALL, S. C.; MICHAEL, G. J.; MICHAEL-TITUS, A. T. Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 10, p. 2091–2102, ago. 2010.

EADY, T. N. et al. Docosahexaenoic Acid Signaling Modulates Cell Survival in Experimental Ischemic Stroke Penumbra and Initiates Long-Term Repair in Young and Aged Rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

EBINGER, M. et al. Imaging the penumbra - strategies to detect tissue at risk after ischemic stroke. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 178–187, 2009.

EHNINGER, D.; KEMPERMANN, G. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Cell and Tissue Research**, v. 331, n. 1, p. 243–250, jan. 2008.

EL MAAROUF, A.; RUTISHAUSER, U. Removal of polysialic acid induces aberrant pathways, synaptic vesicle distribution, and terminal arborization of retinotectal axons. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 460, n. 2, p. 203–211, maio 2003.

FARZANEHFAR, P. Comparative review of adult midbrain and striatum neurogenesis with classical neurogenesis. **Neuroscience Research**, 2018.

FJETLAND, L.; ROY, S. Transcarotid Endovascular Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 29, n. 7, p. 1006–1010, jul. 2018.

FRERET, T. et al. On the importance of long-term functional assessment after stroke to improve translation from bench to bedside. **Experimental & Translational Stroke Medicine**, v. 3, n. 1, p. 6, 18 jun. 2011.

FUKUDA, S. et al. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 28, p. 9357–9366, out. 2003.

GARCIA, A. D. R. et al. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 11, p. 1233–1241, nov. 2004.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox Biology**, v. 6, p. 524–551, dez. 2015.

HALEY, M. J.; LAWRENCE, C. B. The blood-brain barrier after stroke: Structural studies and the role of transcytotic vesicles. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 37, n. 2, p. 456–470, 2016.

HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1387–1394, 2007.

HASHIMOTO, M. et al. Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 579–597, 2017.

HATAKEYAMA, J. et al. Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. **Development (Cambridge, England)**, v. 141, n. 8, p. 1671–82, 15 abr. 2014.

HENDERSON, S. J.; WEITZ, J. I.; KIM, P. Y. Fibrinolysis: Strategies to enhance the treatment of acute ischemic stroke. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 28 jun. 2018.

HERTZ, L. et al. Role of the Astrocytic Na(+), K(+)-ATPase in K(+) Homeostasis in Brain: K(+) Uptake, Signaling Pathways and Substrate Utilization. **Neurochemical research**, v. 40, n. 12, p. 2505–16, 3 dez. 2015.

HILDEBRANDT, H.; DITYATEV, A. Polysialic Acid in Brain Development and Synaptic Plasticity. In: **Topics in current chemistry**. [s.l: s.n.]. v. 366p. 55–96.

HIRANO, T. Evaluation of Cerebral Perfusion in Patients Undergoing Intravenous Recombinant Tissue Plasminogen Activator Thrombolysis. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 55, n. 10, p. 789–795, 2015.

HONG, S.-H. et al. Docosahexaenoic acid improves behavior and attenuates blood–brain barrier injury induced by focal cerebral ischemia in rats. **Experimental & Translational Stroke Medicine**, v. 7, n. 1, p. 3, 2015.

HONG, S. H. et al. Docosahexaenoic acid confers enduring neuroprotection in experimental stroke. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 338, n. 1–2, p. 135–141, 2014.

HOSSMANN, K.-A. Pathophysiological basis of translational stroke research. **Folia neuropathologica**, v. 47, n. 3, p. 213–27, 2009.

HU, X. et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 43, n. 11, p. 3063–3070, 2012.

HU, X. et al. Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. **Circulation research**, v. 120, n. 3, p. 449–471, 3 fev. 2017.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: From mechanisms to translation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 7, p. 796–808, 2011.

IADECOLA, C.; ANRATHNER, J. The immunology of stroke: from mechanism to translation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 7, p. 796–808, 2012.

IRVINE, H. J. et al. Reperfusion after ischemic stroke is associated with reduced brain edema. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, p. 0271678X1772055, 21 jul. 2017.

JERNIGAN, T. L.; STILES, J. Construction of the human forebrain. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 8, n. 1–2, p. e1409, jan. 2017.

- JIN, R. et al. Taurine Reduces tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator)-Induced Hemorrhage and Microvascular Thrombosis After Embolic Stroke in Rat. **Stroke**, v. 49, n. 7, p. 1708–1718, jul. 2018.
- JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 5, p. 779–789, 2010.
- JOHNSON, M. A.; ABLES, J. L.; EISCH, A. J. Cell-intrinsic signals that regulate adult neurogenesis in vivo: insights from inducible approaches. **BMB reports**, v. 42, n. 5, p. 245–259, maio 2009.
- KEMPERMANN, G. et al. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 8, p. 447–452, ago. 2004.
- KERNIE, S. G.; PARENT, J. M. Forebrain Neurogenesis after Focal Ischemic and Traumatic Brain Injury. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 2, p. 267–274, fev. 2010.
- KHAN, T. et al. Deep Vein Thrombosis in Acute Stroke - A Systemic Review of the Literature. **Cureus**, v. 9, n. 12, p. e1982, 23 dez. 2017.
- KOIZUMI, H. et al. Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 779–786, jun. 2006.
- KRISTIÁN, T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. **Cell calcium**, v. 36, n. 3–4, p. 221–33, set. 2004.
- KRONENBERG, G. et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 4, p. 455–463, dez. 2003.
- KUHN, H. G. et al. Detection and Phenotypic Characterization of Adult Neurogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 3, p. a025981, 1 mar. 2016.
- KUHN, H. G.; COOPER-KUHN, C. M. Bromodeoxyuridine and the detection of neurogenesis. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 127–31, jun. 2007.
- LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 750–761, 2011.
- LEE, W.-C. et al. Lipid peroxidation dysregulation in ischemic stroke: Plasma 4-HNE as a potential biomarker? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 4, p. 842–847, set. 2012.

LEE, Y. et al. Therapeutically targeting neuroinflammation and microglia after acute ischemic stroke. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LI, X.-M. et al. Contribution of downregulation of L-type calcium currents to delayed neuronal death in rat hippocampus after global cerebral ischemia and reperfusion. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 19, p. 5249–59, 9 maio 2007.

LIE, D.-C. et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1370–5, 27 out. 2005.

LIND, D. et al. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. **Journal of neuroscience research**, v. 79, n. 3, p. 295–302, 1 fev. 2005.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 11, p. a019034, 2 nov. 2015.

LIU, X.-Y. et al. Stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor exhibit therapeutic effects in a mouse model of CADASIL. **Neurobiology of disease**, v. 73, p. 189–203, jan. 2015.

LIU, Z.; CHOPP, M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. **Progress in Neurobiology**, v. 21, n. 2, p. 129–139, 2017.

LIVESAY, S. L. Clinical Review and Implications of the Guideline for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke. **AACN Advanced Critical Care**, v. 25, n. 2, p. 130–141, 2014.

LLOYD-JONES, D. et al. Heart Disease and Stroke Statistics--2010 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 121, n. 7, p. e46–e215, 23 fev. 2010.

LO, E. H. A new penumbra: Transitioning from injury into repair after stroke. **Nature Medicine**, v. 14, n. 5, p. 497–500, 2008.

LOURBOPOULOS, A.; ERTÜRK, A.; HELLAL, F. Microglia in action: how aging and injury can change the brain's guardians. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. February, p. 1–8, 2015.

MARCHESELLI, V. L. et al. Novel Docosanoids Inhibit Brain Ischemia-Reperfusion-mediated Leukocyte Infiltration and Pro-inflammatory Gene Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 44, p. 43807–43817, 2003.

MARCHESELLI, V. L. et al. Neuroprotectin D1/protectin D1 stereoselective and specific binding with human retinal pigment epithelial cells and neutrophils. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 1, p. 27–34, jan. 2010.

MING, G.; SONG, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 687–702, maio 2011.

MOGOANTĂ, L. et al. Study of vascular microdensity in areas of cerebral ischemia on experimental model. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 51, n. 4, p. 725–731, 2010.

MOLINA-HOLGADO, E.; MOLINA-HOLGADO, F. Mending the broken brain: Neuroimmune interactions in neurogenesis: REVIEW. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 5, p. 1277–1290, 2010a.

MOLINA-HOLGADO, E.; MOLINA-HOLGADO, F. Mending the broken brain: neuroimmune interactions in neurogenesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 5, p. 1277–1290, set. 2010b.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181–98, 29 jul. 2010.

MOZAFFARIAN, D. et al. **Heart disease and stroke statistics-2015 update : A report from the American Heart Association**. [s.l.: s.n.]. v. 131

MU, Y.; LEE, S. W.; GAGE, F. H. Signaling in Adult Neurogenesis. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 20, n. 4, p. 416–423, 2010.

MUKHERJEE, P. K. et al. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 22, p. 8491–6, 2004.

MURALIKRISHNA ADIBHATLA, R.; HATCHER, J. F. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 3, p. 376–387, fev. 2006.

NAGHAVI, M. et al. Global , regional , and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death , 1990-2013 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet (London, England)**, v. 385, n. 9963, p. 117–171, 2015.

NASH, K. M.; SCHIEFER, I. T.; SHAH, Z. A. Development of a reactive oxygen species-sensitive nitric oxide synthase inhibitor for the treatment of ischemic stroke. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 115, p. 395–404, 1 fev. 2018.

NEUMANN, H.; KOTTER, M. R.; FRANKLIN, R. J. M. Debris clearance by microglia: An essential link between degeneration and regeneration. **Brain**, v. 132, n. 2, p. 288–295, 2009.

NOUH, A. et al. Embolic Strokes of Unknown Source and Cryptogenic Stroke: Implications in Clinical Practice. **Frontiers in neurology**, v. 7, p. 37, 2016.

OBENAUS, A.; DILMAC, N.; TONE, B. Long-term magnetic resonance imaging of stem cells in neonatal ischemic injury. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 2, p. 282–291, 2011.

OHAB, J. J. et al. A Neurovascular Niche for Neurogenesis after Stroke. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 50, p. 13007–13016, dez. 2006.

OLMEZ, I.; OZYURT, H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. **Neurochemistry International**, v. 60, n. 2, p. 208–212, jan. 2012.

PAN, J. et al. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. **Neuroradiology**, v. 49, n. 2, p. 93–102, 2007.

PARENT, J. M. et al. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. **Annals of neurology**, v. 52, n. 6, p. 802–13, dez. 2002.

PATEL, R. A. G.; MCMULLEN, P. W. Neuroprotection in the Treatment of Acute Ischemic Stroke. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 59, n. 6, p. 542–548, 2017.

PRADEEP, H. et al. Oxidative stress--assassin behind the ischemic stroke. **Folia neuropathologica**, v. 50, n. 3, p. 219–30, 2012.

PRAKASH, R.; CARMICHAEL, S. T. Blood–brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 28, n. 6, p. 556–564, 2015.

RAO, M. S.; SHETTY, A. K. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 234–246, 2004.

READNOWER, R. D. et al. Increase in blood-brain barrier permeability, oxidative stress, and activated microglia in a rat model of blast-induced traumatic brain injury. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 16, p. 3530–3539, dez. 2010.

ROSENBERG, G. A. Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1139–1151, 2012.

RUAN, L. et al. Neurogenesis in neurological and psychiatric diseases and brain injury: from bench to bedside. **Progress in neurobiology**, v. 115, p. 116–37, abr. 2014.

RUAN, L. et al. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. **Brain Research**, v. 1623, n. 4, p. 166–173, out. 2015.

RUSNAKOVA, V. et al. Heterogeneity of Astrocytes: From Development to Injury - Single Cell Gene Expression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

SACCO, R. L. et al. An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 44, n. 7, p. 2064–2089, 1 jul. 2013.

SAHOTA, P.; SAVITZ, S. I. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. **Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 8, n. 3, p. 434–51, 21 jul. 2011.

SAKAYORI, N. et al. Distinctive effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on neural stem/progenitor cells. **Genes to Cells**, v. 16, n. 7, p. 778–790, 2011.

SANTOS, T. et al. Polymeric nanoparticles to control the differentiation of neural stem cells in the subventricular zone of the brain. **ACS nano**, v. 6, n. 12, p. 10463–10474, 2012.

SARKAR, A. et al. Nanoparticles as a Carrier System for Drug Delivery Across Blood Brain Barrier. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 129–137, 21 mar. 2017.

SCALZO, F.; NOUR, M.; LIEBESKIND, D. S. Data Science of Stroke Imaging and Enlightenment of the Penumbra. **Frontiers in Neurology**, v. 6, 5 mar. 2015.

SEKERDAG, E.; SOLAROGLU, I.; GURSOY-OZDEMIR, Y. Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. **Current Neuropharmacology**, v. 16, 21 mar. 2018.

SERHAN, C. N. et al. Novel Proresolving Aspirin-Triggered DHA Pathway. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 8, p. 976–987, 26 ago. 2011.

SERHAN, C. N. et al. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 397–413, 2015.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. n. January, p. 1–37, 2018.

SHIN, W. H. et al. Microglia Expressing Interleukin-13 Undergo Cell Death and Contribute to Neuronal Survival in Vivo. **Glia**, v. 46, n. 2, p. 142–152, 2004.

SHOHAYEB, B. et al. Factors that influence adult neurogenesis as potential therapy. **Translational Neurodegeneration**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2018.

SIBBE, M.; KULIK, A. GABAergic Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5497–5510, 6 set. 2017.

SIMOPOULOS, A. P. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 6, p. 674–688, 2008.

SONG, D. et al. Inhibition of brain swelling after ischemia-reperfusion by β -adrenergic antagonists: correlation with increased K^+ and decreased Ca^{2+} concentrations in extracellular fluid. **BioMed research international**, v. 2014, p. 873590, 2014.

SONG, N.-N. et al. Divergent Roles of Central Serotonin in Adult Hippocampal Neurogenesis. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, p. 185, 30 jun. 2017.

STAROSSOM, SARAH; MASCANFRONI, IVAN; IMITOLA, JAIME; CAO, LI; RADDASSI, KHADIR; HERNANDEZ, SILVIA; BASSIL, RIBAL; CROCI, DIEGO; CERLIANI, JUAN; DELACOUR, DELPHINE; WANG, YUE; ELYAMAN, WASSIN; KHOURY, SAMIA; RABINOVICH, G. Galectin-1 Deactivates Classically-Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration. **Immunity**, v. 236, n. 2, p. 47–56, 2013.

STARY, C. M.; LI, L.; GIFFARD, R. G. Central Neuroinflammation in Cerebral Ischemia: The Role of Glia. **Primer on Cerebrovascular Diseases**, p. 135–138, 1 jan. 2017.

STOLLG, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 3, p. 233–247, 1999.

T. RONALDSON, P.; P. DAVIS, T. Blood-Brain Barrier Integrity and Glial Support: Mechanisms that can be Targeted for Novel Therapeutic Approaches in Stroke. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 25, p. 3624–3644, 2012.

TAKANO, T. et al. Astrocytes and ischemic injury. **Stroke**, v. 40, n. 3 SUPPL. 1, p. 1–9, 2009.

TANO, J.-Y.; GOLLASCH, M. Calcium-activated potassium channels in ischemia reperfusion: a brief update. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 381, 6 out. 2014.

TAYLOR, R. A.; SANSING, L. H. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, n. Figure 1, 2013.

THIYAGARAJAN, M. et al. Activated Protein C Promotes Neovascularization and Neurogenesis in Postischemic Brain via Protease-Activated Receptor 1. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 48, p. 12788–12797, 2008.

THOMPSON, S. N. et al. Relationship of calpain-mediated proteolysis to the expression of axonal and synaptic plasticity markers following traumatic brain injury in mice. **Experimental Neurology**, v. 201, n. 1, p. 253–265, 2006.

TOWFIGHI, A. et al. Randomized controlled trial of a coordinated care intervention to improve risk factor control after stroke or transient ischemic attack in the safety net: Secondary stroke prevention by Uniting Community and Chronic care model teams Early to End Disparities (SUCCEED). **BMC neurology**, v. 17, n. 1, p. 24, 6 fev. 2017.

UGIDOS, I. F. et al. Neuroprotective effect of 2-hydroxy arachidonic acid in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1859, n. 9, p. 1648–1656, set. 2017.

VAN LEYEN, K. Eicosanoids in Cerebrovascular Diseases. In: **Primer on Cerebrovascular Diseases**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 86–89.

VAN PRAAG, H. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1030–1034, 2002.

VIDALE, S. et al. Mechanical Thrombectomy in Strokes with Large-Vessel Occlusion Beyond 6 Hours: A Pooled Analysis of Randomized Trials. **Journal of Clinical Neurology**, v. 14, n. 3, p. 407, jul. 2018.

VON BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 3, p. 409–420, 2007.

VON BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. **Cell and Tissue Research**, v. 345, n. 1, p. 1–19, 2011.

WALTER, J. The triggering receptor expressed on myeloid cells 2: A Molecular link of neuroinflammation and neurodegenerative diseases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 9, p. 4334–4341, 2016.

WANG, X. et al. Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain in vivo. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 29, n. 10, p. 1644–54, 17 out. 2009.

WEXLER, E. M. et al. Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 5, p. 1130–41, maio 2009.

XU, J. et al. l-3-n-butylphthalide improves cognitive deficits in rats with chronic cerebral ischemia. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 7, p. 2424–2429, jun. 2012.

YAMATO, M.; EGASHIRA, T.; UTSUMI, H. Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. **Free radical biology & medicine**, v. 35, n. 12, p. 1619–31, 15 dez. 2003.

YANG, YI; ROSEMBERG, G. Blood-Brain Barrier Breakdown in Acute and Chronic Cerebrovascular Disease. **Stroke**, v. 42, n. 11, p. 3323–3328, 2013.

YANG, Y.; ROSENBERG, G. A. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. **Stroke**, v. 42, n. 11, p. 3323–3328, 2011.

YAO, C. et al. Neuroprotectin D1 attenuates brain damage induced by transient middle cerebral artery occlusion in rats through TRPC6/CREB pathways. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 543–550, 2013.

YU, S. et al. Sulfiredoxin-1 protects primary cultured astrocytes from ischemia-induced damage. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 19–27, 2015.

WHO (World Health Organization). Neurological disorders. 2006. Disponível em: <www.who.int/entity/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf>. Acesso em: 24 julho de 2018.

ZARROUKI, B. et al. The lipid peroxidation end-product 4-HNE induces COX-2 expression through p38MAPK activation in 3T3-L1 adipose cell. **FEBS letters**, v. 581, n. 13, p. 2394–400, 29 maio 2007.

ZENDEDEL, A. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate neuroinflammation and mitigate ischemic stroke damage through interactions with astrocytes and microglia. **Journal of Neuroimmunology**, v. 278, p. 200–211, 15 jan. 2015.

ZHANG, R. et al. Bcl-2 enhances neurogenesis and inhibits apoptosis of newborn neurons in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion. **Neurobiology of Disease**, v. 24, n. 2, p. 345–356, 2006.

ZHANG, W. et al. Dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids robustly promotes neurovascular restorative dynamics and improves neurological functions after stroke. **Experimental neurology**, v. 272, p. 170–80, out. 2015.

ZHOU, X.; SPITTAU, B.; KRIEGLSTEIN, K. TGF β signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 1, 2012.

ANEXO

ANEXO I – FOLHA DE APROVAÇÃO DA INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC)



Amendment: Change in Personnel

Request to remove or add personnel to IBC, IACUC, IRB Projects [Version 8.07.2015]

INSTRUCTIONS: ALWAYS download the latest version, and then save this form before completing it. Submit this form in its original format by email to IBCoffice@lsuhsc.edu. The IBC will forward this form to the IRB and/or IACUC to complete the process. *Coordinator/Co-investigator submitting in behalf of the PI must Cc the PI on the mail.*

Electronic Submission Date:
 From: Chiappinelli, Brenda
 Sent: Thursday, September 24, 2015 1:53 PM
 To: IACUC Office <IACUCoffice@lsuhsc.edu>
 Cc: Bazan, Nicolas <NBazan@lsuhsc.edu>; Belayev, Ludmila S. <lbelay@lsuhsc.edu>; Khouorova, Larissa <lkhout@lsuhsc.edu>; Sousa Freitas, Raul <rsousa@lsuhsc.edu>
 Subject: amendment

Principal Investigator: **Nicolas Bazan, MD. PhD**

Email: nbazan@lsuhsc.edu Office Telephone: **504-599-0831**

Copy email correspondence to: **Brenda Chiappinelli** Email: bchiap@lsuhsc.edu

1. Complete the table for all applicable projects affected by this change.

IBC #	A#	IACUC#	A#	IRB#	A#	Project Title
14324		3239	3			Neuroprotection Lipid Signaling in Ischemia Reperfusion
15244		3251	1			Motor Circuits protection in experimental ischemia stroke
11018		3122	4			Behavioral Studies after stroke and Traumatic Brain injury

2. Provide the names of the individual who you are removing from participation in this project.

If only removing personnel at this time, STOP here and submit the form.

3. Provide the demographic information of the individual you authorize to participate. *One individual per form.*

Name: **Raul Sousa Freitas** Degree: **Masters**

Campus Office Address and Room Number: **Lions 935**

If Off-Campus, provide US Mail Address: _____

School of: **Medicine** Department of: **Neuroscience**

Email: rsousa@lsuhsc.edu Office Phone: **504-599-0909** Mobile Phone: **504-919-2851** Fax: _____

If student, Status: student graduate student fellow resident

Project Type: Thesis or Capstone/Dissertation (Masters/PhD) Student Project for Course

Name of Course: _____

If this individual is not an employee or student of LSUHSC-NO, provide the name of his/her institution.

Submit documentation of the required training (*see #6 below for alternative self-study courses*).

Institutional Affiliation and Department: **Universidade Federal Do Ceara, Dept of Morphology**

Institutional Mailing Address: **Secretaria de Pos-Graduacao em Ciencias de Morfofuncionais, Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceara, Rua Delmiro de Farias S?N, Fortaleza, Brazil**

IRB of Record _____ Attach or submit a copy of approval the when available.

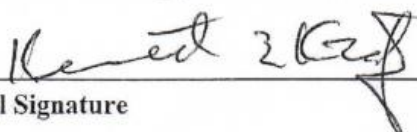
Is a copy of the CV attached? _____

Working with Animals In Biomedical Research-Refresher Course	CITI every 3 years	
Complete applicable courses related to activities to be performed. (Required only once)		
Aseptic Surgery	CITI	8/24/15
Reducing Pain and Distress in Laboratory Mice and Rats	CITI	8/25/15
List Species Working with in Research Settings: mice	CITI	8/24/15
List Species Working with in Research Settings: rats	CITI	8/25/15
List Species Working with in Research Settings:	CITI	
Human Subject Research Training	Type	Date Completed
Complete applicable courses related to type of research to be performed, initial and 3 Year Refresher		
Biomedical Research - Initial Course	CITI once	
Choose at least one elective:		
Social and Behavioral Research for Biomedical Researchers		
Vulnerable Subjects - Involving Prisoners		
Vulnerable Subjects - Involving Children		
Vulnerable Subjects - Involving Pregnant Women, Human Fetuses, Neonates		
Internet Research - SBR		
Biomedical Research - Refresher Course	CITI every 3 years	
Social & Behavioral Research - Initial Course	CITI once	
Choose at least one elective:		
Research with Prisoners - SBR		
Research with Children - SBR		
Research in Public Elementary and Secondary Schools - SBR		
Vulnerable Subjects - Involving Pregnant Women, Human Fetuses, Neonates		
Internet Research - SBR		
Biomedical Research - Refresher Course	CITI every 3 years	
Social & Behavioral Research - Initial Course	CITI once	
Choose at least one elective:		
Research with Prisoners - SBR		
Research with Children - SBR		
Research in Public Elementary and Secondary Schools - SBR		
Vulnerable Subjects - Involving Pregnant Women, Human Fetuses, Neonates		
Internet Research - SBR		
Social & Behavioral Research-Refresher Course	CITI every 3 years	
GCP - Drug Development Gradebook - Initial Course: Conducting Studies According to FDA Regulations & Good Clinical Practices	CITI once	
GCP - Drug Development Gradebook - Refresher Course	CITI every 3 years	
GCP - Device Development Gradebook - Initial Course: Conducting Studies According to FDA Regulations & Good Clinical Practices	CITI once	
GCP - Device Development Gradebook - Refresher Course	CITI every 3 years	
Other IRB training:		

By submission of this amendment, the Principal Investigator of this project attest that the information contained in this application is accurate and complete and attests to the following statements. I accept the responsibility for the safe conduct of work with this study at the Biological Safety Level practices and procedures assigned by the IBC. I will inform all personnel, who may be at risk of potential exposure of the conditions of this work. I assure that all personnel will receive adequate training to perform all activities safely and proficiently. I will not carry out the work described in the attached application until it has been approved by the IBC/IACUC/IRB, where applicable, and all requirements have been met. Where applicable, I agree to comply with the NIH requirements pertaining to conducting research and the shipment and transfer of recombinant DNA materials. I acknowledge my responsibility for the conduct of this research in accordance with LSUHSC-NO policies and the NIH Guidelines.

Processed by: _____ IBC _____ IACUC _____ IRB

This amendment was administratively approved. Annual re-approval will be bound to the approved date of the application which this document amends.


Approval Signature


Date of Approval

ANEXO IV – ARTIGO PUBLICADO 1

Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1136-3>



Docosanoids Promote Neurogenesis and Angiogenesis, Blood-Brain Barrier Integrity, Penumbra Protection, and Neurobehavioral Recovery After Experimental Ischemic Stroke

Ludmila Belayev¹ · Sung-Ha Hong^{1,2} · Hemant Menghani^{1,3} · Shawn J. Marcell¹ · Andre Obenaus⁴ · Raul S. Freitas^{1,5} · Larissa Khoutorova¹ · Veronica Balaszczuk¹ · Bokkyoo Jun¹ · Reinaldo B. Oriá^{1,5} · Nicolas G. Bazan¹

Received: 16 April 2018 / Accepted: 18 May 2018
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Docosahexaenoic acid (DHA) and neuroprotectin D1 (NPD1) are neuroprotective after experimental ischemic stroke. To explore underlying mechanisms, SD rats underwent 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAo) and treated with DHA (5 mg/kg, IV) or NPD1 (5 µg/per rat, ICV) and vehicles 1 h after. Neuro-behavioral assessments was conducted on days 1, 2, and 3, and on week 1, 2, 3, or 4. BrdU was injected on days 4, 5, and 6, immunohistochemistry was performed on week 2 or 4, MRI on day 7, and lipidomic analysis at 4 and 5 h after onset of stroke. DHA improved short- and long-term behavioral functions and reduced cortical, subcortical, and total infarct volumes (by 42, 47, and 31%, respectively) after 2 weeks and reduced tissue loss by 50% after 4 weeks. DHA increased the number of BrdU⁺/Ki-67⁺, BrdU⁺/DCX⁺, and BrdU⁺/NeuN⁺ cells in the cortex, subventricular zone, and *dentate gyrus* and potentiated NPD1 synthesis in the penumbra at 5 h after MCAo. NPD1 improved behavior, reduced lesion volumes, protected ischemic penumbra, increased NeuN, GFAP, SMI-71-positive cells and vessels, axonal regeneration in the penumbra, and attenuated blood-brain barrier (BBB) after MCAo. We conclude that docosanoid administration increases neurogenesis and angiogenesis, activates NPD1 synthesis in the penumbra, and diminishes BBB permeability, which correlates to long-term neurobehavioral recovery after experimental ischemic stroke.

Keywords Omega-3 fatty acids · Behavior · MRI · BBB · Neuroprotection

Introduction

Stroke is the fifth leading cause of death in the USA and the primary cause of long-term disability [1]. Only one FDA-approved therapy exists for treatment of acute ischemic stroke, the thrombolytic tissue plasminogen activator (tPA), but unfortunately, only 3–5% of patients can be elected to undergo this treatment [2, 3]. Therefore, an effective treatment for stroke remains an unmet health care need.

Currently, translational enabling research strategies, in addition to neuroprotection, include neurorestoration to enhance post-stroke tissue repair [4, 5]. A mechanism for neurorestoration is neurogenesis activation, which occurs in the subgranular zone of the *dentate gyrus* (DG) and the subventricular zone of the lateral ventricles [5]. Newborn neurons are generated from neural stem/progenitor cells in the subgranular zone (SGZ) of the DG through differentiation and maturation. Ischemic injury induces neurogenesis and promotes migration of neuroblasts along the blood vessels

✉ Ludmila Belayev
 lbelay@lsuhsc.edu

¹ Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health New Orleans, 2020 Gravier St., New Orleans, LA 70112, USA

² Present address: UT Health, McGovern Medical School, University of Texas Health Sciences Center at Houston, Houston, TX 77030, USA

³ Department of Pediatrics, Hematology-Oncology, Louisiana State University Health New Orleans and Children's Hospital of New Orleans, New Orleans, LA 70118, USA

⁴ Department of Pediatrics, University of California, Irvine, Irvine, CA 92697, USA

⁵ Present address: Laboratory of the Biology of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

NEXO IV – ARTIGO PUBLICADO 2



Revisiting Inbred Mouse Models to Study the Developing Brain: The Potential Role of Intestinal Microbiota

Reinaldo B. Oriá^{1*}, João O. Malva², Patrícia L. Foley³, Raul S. Freitas¹, David T. Bolick⁴ and Richard L. Guerrant⁴

¹Laboratory of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and the Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil, ²Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (ICBR), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ³Division of Comparative Medicine, Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University, Washington, DC, United States, ⁴Division of Infectious Diseases and International Health, Center for Global Health, University of Virginia, Charlottesville, VA, United States

Keywords: mouse models, developing brain, immune system, environment, intestinal microbiota

OPEN ACCESS

Edited by:

John R. Lukens,
University of Virginia, United States

Reviewed by:

Paras K. Anand,
Imperial College London,
United Kingdom
Attila Szabo,
University of Oslo, Norway

*Correspondence:

Reinaldo B. Oriá
rbo5u@virginia.edu;
reinaldo70.oria@gmail.com

Received: 01 June 2018

Accepted: 20 August 2018

Published: 19 September 2018

Citation:

Oriá RB, Malva JO, Foley PL,
Freitas RS, Bolick DT and Guerrant RL
(2018) Revisiting Inbred Mouse
Models to Study the Developing Brain:
The Potential Role of Intestinal
Microbiota.
Front. Hum. Neurosci. 12:358.
doi: 10.3389/fnhum.2018.00358

The life-long cumulative exposures (exposome) to environmental contaminants (even low-grade lead, mercury, arsenic etc.) and biological hazards (favoring enteric pathogens and altered “unhealthy” intestinal microbiota) alone or in combination are now being increasingly recognized to deleteriously influence the brain’s development and potentially the way the brain copes with aging-related conditions, including neurodegenerative diseases (Costa et al., 2004; Senut et al., 2012; Tshala-Katumbay et al., 2015). The latter may involve sub-optimal development of “cognitive reserve,” which is likely dependent upon a “healthy” and enriched environment to which one is exposed early in life. The potential importance of cognitive reserves to protect from aging-related neurodegeneration is suggested by post-mortem evidence showing that some individuals are better adapted to Alzheimer’s disease (AD) related brain injury than others (Marques et al., 2016); some patients who show post-mortem beta-amyloid plaques in the brain had not suffered from AD symptoms during life.

The early life intestinal microbiome is now being acknowledged as a determinant factor influencing human behavior (Oriá et al., 2016; Lima-Ojeda et al., 2017; Carlson et al., 2018) and for immune system maturation (Mulder et al., 2011; Olszak et al., 2012; Nash et al., 2017). If chronically disrupted it may even predispose individuals to neuropsychiatric diseases later in life (Petra et al., 2015; Lima-Ojeda et al., 2017). In addition, in the first 2 years of life, a critical period when key processes toward brain maturation such as myelination and synaptogenesis occur, the intestinal microbiota have not yet reached full “adulthood” maturation (Fanaro et al., 2003; Olivares et al., 2018). As these biological processes overlap in this critical period, environmental challenges early in life, such as enteric diseases, malnutrition and altered maturation of the intestinal microbiota may jeopardize the cognitive development and cause later life metabolic dysfunction in these children (DeBoer et al., 2012; Guerrant et al., 2013). However in spite of the potential implications of early-life microbiota colonization to life-long health, animal models (such as germ-free and antibiotic treatment) widely used to study causal relationship with gut microbiota have limitations in how they affect the brain, and in their ability to model human conditions where environmental conditions are dynamic and constantly changing. Furthermore, the use of mouse models to research into microbiome-brain-immune should be taken with caution, since the species composition of the gut microbiota (and its regulation) can be fairly dissimilar in distinct mammalian taxa (Ericsson and Franklin, 2015; Laukens et al., 2016), therefore findings from mouse gut research may not

ANEXO V – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

256

52. LIPID MEDIATORS

CHAPTER

52

Lipid Mediators

L. Belayev, R.S. Freitas, S.J. Marcell, N.G. Bazan

Louisiana State University Health New Orleans, New Orleans, LA, United States

PLATELET-ACTIVATING FACTOR AND OTHER BIOACTIVE LIPIDS

A target for cerebral ischemia is phospholipids from plasma membranes of neural cells. Phospholipid molecules of membranes from neurons, glial cells, and other neural cells store a variety of lipid messengers. Receptor-mediated events, or changes in intracellular events [Ca^{2+}], such as those that occur during excitatory neurotransmission in activity-dependent synaptic plasticity, uncompensated oxidative stress, and other disruptors of homeostasis, activate phospholipases that catalyze the release of precursors of bioactive mediators from phospholipids. These messengers then participate in intracellular and/or intercellular signaling pathways. Accordingly, contemporary research into bioactive lipids has focused on their neurobiological significance and role in diseases.

Cerebral ischemia unsettles the tightly regulated events that control the production and accumulation of lipid messengers and their precursors, such as docosahexaenoic acid (DHA), free arachidonic acid (AA), diacylglycerol, and platelet-activating factor (PAF, 1-O-alkyl-2-acyl-*sn*-3-phosphocholine), under physiological conditions. Rapid activation of phospholipases, particularly of phospholipase A_2 (PLA_2), occurs at the onset of cerebral ischemia [1]. There are a wide variety of PLA_2 s and current investigations aim to define those affected by ischemia. For example, in addition to the role(s) of intracellular PLA_2 s in lipid messenger formation, a low-molecular-weight secretory PLA_2 synergizes glutamate-induced neuronal damage. Pathways leading to PLA_2 activation/release are part of normal neuronal function, whereas ischemia-reperfusion enhances these events, overproducing PLA_2 -derived lipid messengers (e.g., enzymatically produced AA or DHA oxygenation derivatives, nonenzymatically generated lipid peroxidation products, and other reactive oxygen species)

involved in neuronal damage. Among the consequences of PLA_2 activation by ischemia are alterations in mitochondrial function by the rapid increase in the brain free fatty acid pool size (e.g., uncoupling of oxidative phosphorylation from respiratory chain) and the generation of lipid messengers.

PAF is a very potent and short-lived lipid messenger. It is known to have a wide range of actions: as a mediator of inflammatory and immune responses, as a second messenger, and as a potent inducer of gene expression in neural systems. Thus, in addition to its acute roles, PAF can potentially mediate longer-term effects on cellular physiology and brain functions.

PLATELET-ACTIVATING FACTOR CONTRIBUTES TO EXCITOTOXICITY BY ENHANCING GLUTAMATE RELEASE

PAF accumulates during cerebral ischemia, and inhibition of this process plays a critical role in neuronal survival. PAF is a potent, short-lived phospholipid mediator of leukocyte functions, platelet aggregation, and proinflammatory signaling [1]. PAF accumulates in the brain after cerebral ischemia, and, in conjunction with glutamate release and glutamate reuptake inhibition, leads to intracellular Ca^{2+} overload, mitochondrial dysfunction, generation of reactive oxygen species, and inflammation-mediated excitotoxicity [2]. Furthermore, the brain is endowed with a variety of degradative enzymes that rapidly convert PAF to biologically inactive lyso-PAF [1]. Taking these findings together, PAF, when overproduced at the synapse during ischemia, will promote enhanced glutamate release that in turn, through the activation of postsynaptic receptors, will contribute to excitotoxicity. Fig. 52.1 outlines the role of PAF as a presynaptic messenger.

We demonstrated that LAU-0901, a novel PAF receptor antagonist (Figs. 52.1 and 52.2), is neuroprotective in